

BEDEUTUNG DES KODONGEBRAUCHS FÜR DIE ZEITLICH  
REGULIERTE GENEXPRESSION IM RAHMEN DER HIV-  
REPLIKATION: ANSATZPUNKTE FÜR DIE ENTWICKLUNG  
ATTENUierter LEBENDIMPFSTOFFE?

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III -  
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON  
**STEPHANIE STECK**  
AUS DILLINGEN A. D. DONAU

April 2003

---

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Oktober 1999 und April 2003 am Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene an der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 05.05.2003

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. R. Wagner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. G. Hauska  
Prüfungsausschuß: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer  
Prof. Dr. R. Wagner  
Prof. Dr. A. Kurtz  
(Prof. Dr. M. Thomm als Ersatzprüfer)

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

---

Stephanie Steck

---

*Manche Menschen sehen die Dinge, so wie sie sind,  
und fragen: „Warum?“  
Ich träume von Dingen, die es noch nie gegeben hat,  
und frage: „Warum nicht?“*

*G. B. Shaw*

---

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>A. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
A.1. Epidemiologie, Ursprung, Genomaufbau und Vermehrungszyklus von HIV-1 .....	1
A.1.1. Epidemiologie .....	1
A.1.2. Ursprung .....	1
A.1.3. Genomaufbau.....	2
A.1.4. Vermehrungszyklus .....	3
Frühe Phase der Replikation.....	3
Späte Phase der Replikation .....	4
A.2. Posttranskriptionelle Regulation bei HIV-1 durch Rev.....	7
Charakteristika von Rev, sein Kernimport ... ..	8
... und Rev-vermittelter Kernexport.....	8
Einfluss zellulärer Faktoren beim Rev-vermittelten Kernexport .....	10
... und bei der Prozessierung viraler, ungespleißter und einfach gespleißter RNA.....	11
Cis-aktive Sequenzmotive innerhalb viraler, RRE-haltiger RNA.....	12
Wirkung von Rev/RRE im Zytoplasma.....	13
A.3. Therapieansätze gegen HIV-1 und Anwendungsmöglichkeiten des Rev/RRE- Systems .....	13
Pharmazeutische Therapieansätze .....	13
Pharmazeutische Ansätze gegen das Rev/RRE-System.....	15
Impfstoffentwicklung durch Entkopplung des Rev/RRE-Systems .....	16
Etablierung von Gentherapievektoren durch Entkopplung des Rev/RRE-Systems ....	16
Rev-abhängige Reporter und Screening-Systeme .....	18
A.4. Zielsetzung der Arbeit .....	19
<b>B. Material .....</b>	<b>20</b>
B.1. Reagenzien.....	20
B.2. Bakterienstämme und Nährmedien.....	20
B.2.1. Bakterienstämme.....	20
B.2.2. Nährmedien für Bakterien.....	20
B.2.2.1. Flüssigmedien .....	20
B.2.2.2. Nährböden.....	20
B.3. Eukaryontische Zelllinien und Nährmedien .....	20
B.3.1. Adhärent wachsende Säugerzelllinien .....	20
B.3.2. In Suspension wachsende Säugerzelllinien.....	21
B.3.3. Basalmedien und Zusatzkomponenten für Säugerzelllinien.....	21
B.4. Nukleinsäuren .....	21
B.4.1. Plasmidvektoren.....	21
B.4.2. Plasmide .....	22
B.4.3. Oligonukleotide.....	22
B.4.3.1. PCR-Primer .....	22
B.4.3.2. Sequenzierprimer .....	24
B.5. DNA- / RNA-Molekulargewichtsstandards .....	24
B.6. Protein-Molekulargewichtsstandards .....	24
B.7. Enzyme.....	25
B.8. Antikörper .....	25
B.9. Protease-Inhibitoren.....	26
B.10. Kommerziell erhältliche Kits .....	26

B. 11. Computerprogramme und Datenbanken.....	26
<b>C. Methoden.....</b>	<b>27</b>
C. 1. Allgemeine Zellkulturtechniken (Prokaryonten) .....	27
C.1.1. Anzucht und Kultivierung von Bakterien in Flüssig- und Plattenkultur .....	27
C.1.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien .....	27
C.2. Allgemeine, standardisierte Klonierungstechniken .....	27
C.2.1. Isolierung von DNA.....	27
C.2.1.1. Präparation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	27
C.2.1.2. Präparation von genomischer DNA aus Säugetierzellen .....	28
C.2.2. Reinigung von PCR-Fragmenten.....	28
C.2.3. Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen... 28	
C.2.4. Phosphorylierung von blunt-end DNA-Fragmenten.....	28
C.2.5. Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren.....	28
C.2.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	29
C.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	29
C.2.8. Ligation von Vektor- und Insert-DNA.....	29
C.2.9. Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA .....	29
C.3. PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	30
C.3.1. <i>TaqPlus Precision PCR</i> -System .....	30
C.3.2. Zielgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese mittels PCR.....	31
C.3.3. DNA-Sequenzierung.....	31
C.4. Allgemeine Zellkulturtechniken (Eukaryonten) .....	32
C.4.1. Kultivierung von Säugerzellen.....	32
C.4.2. Bestimmung der Lebendzellzahl.....	32
C.5. Transfektion von Zellen.....	32
C.5.1. Transfektionsmethoden.....	32
C.5.1.1. Transfektion von adhärenenten Zellen durch CaHPO <sub>4</sub> -Präzipitation.....	32
C.5.1.2. Transfektion von Suspensionszellen mit FuGENE 6.....	33
C.5.2. Ernte und Aufarbeitung der Zellen und Zellkulturüberstände nach Transfektion zur Analyse der Expression viraler Proteine .....	33
C.6. Analyse von Proteinen.....	33
C.6.1. Quantitative Proteinbestimmung.....	33
C.6.2. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ....	34
C.6.3. Protein-Färbung mit Coomassie Brilliant Blau.....	34
C.6.4. Detektion spezifischer Proteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Western-Blot.....	35
C.6.4.1. Proteintransfer auf Nitrocellulose: Western-Blot-Analyse .....	35
C.6.4.2. Detektion über eine Enzym/Substrat-vermittelte Farbreaktion .....	35
C.6.4.3. Detektion rekombinanter Proteine durch eine Enzym/Substrat vermittelte Lichtreaktion.....	35
C.6.5. Nachweis von Pr55 <sup>gag</sup> -Lipopolyprotein bzw. p24 durch einen HIV-1 ELISA. 36	
C.6.5.1. Nachweis des Pr55 <sup>gag</sup> -Lipopolyproteins aus transfizierten und lysierten Zellen durch einen HIV-1 p24 <i>Capture Assay</i> -ELISA nach Niedrig.....	36
C.6.5.2. Nachweis von p24 aus transfizierten bzw. infizierten und lysierten Zellen durch einen HIV-1 p24 <i>Capture Assay</i> -ELISA nach Stoiber .....	37
C.7. Anreicherung von Viruspartikeln über Saccharosekissen .....	37
C.8. Isolierung und Analyse von RNA.....	37
C.8.1. Gewinnung von RNA aus adhärenenten Zellen nach Transfektion .....	37

**c**

D.4.1. Herstellung der chimären HI-Proviruskonstrukte .....	76
D.4.2. Expression der chimären HI-Proviren und Nachweis ihrer RNA.....	77
D.4.2.1. Protein-Expression der chimären HI-Proviren .....	77
D.4.2.2. RNA-Enthalpie vom <i>gag</i> -Gen der HI-Proviren.....	82
D.4.2.3. RNA-Verteilung nach Transfektion mit den chimären HI-Proviruskonstrukte .....	83
D.4.3. Infektiösität der chimären HI-Proviren.....	86
D.4.4. Replikationsverhalten der chimären HI-Proviren.....	89
D.4.4.1. Replikationsverhalten der chimären HI-Proviren im “Kurzzeitversuch” ..	89
D.4.4.2. Mutationen in der <i>gag</i> -Sequenz der chimären HI-Proviren nach Kultivierung im “Langzeitversuch” .....	90
D.4.5. Zusammenfassung .....	95
<b>E. Diskussion .....</b>	<b>97</b>
E.1. Bedeutung des Kodongebrauchs für die Genexpression und den nukleären Export von chimären <i>gag</i> -Konstrukten bzw. ihrer nach Transfektion gebildeten RNA (unter und ohne Einfluss <i>cis</i> - und <i>trans</i> -aktiver HI-viraler Elemente) .....	97
E. 1.1. Bedeutung der 5'-Hälfte von <i>wtgag</i> für die Genexpression.....	97
E. 1.2. Detektion von Sequenzmotiven für RNA-bindende Proteine innerhalb von <i>wtgag</i> .....	97
„ <i>A/U-rich elements</i> (ARE)“ .....	97
„Spleißen und daran beteiligte <i>cis</i> - und <i>trans</i> -aktive Elemente“ .....	99
„Regulierende Spleißfaktoren“ .....	99
„Obligate Spleißfaktoren“ .....	101
„ESE ( <i>exon splicing enhancer</i> ) und ESS ( <i>exon splicing silencer</i> )“ .....	102
Sam68 .....	103
E. 1.3. Einfluss von UTR und RRE auf die Expression von <i>gag</i> und auf den nukleären Transport der nach Transfektion gebildeten <i>gag</i> -RNA (unter und ohne Einfluss <i>trans</i> -aktiver HI-viraler Elemente) .....	105
E. 1.4. Einfluss von RRE auf die Expression von <i>gag</i> und auf den nukleären Transport der <i>gag</i> -RNA (unter und ohne Einfluss <i>trans</i> -aktiver HI-viraler Elemente) ..	107
E. 1.5. Schlußfolgerung .....	108
E.2. Bedeutung von „kryptischen“, internen Spleißdonoren für die Genexpression von HI-viralen GFP-Konstrukten und für den nukleären Export der HI-viralen GFP-RNA (unter und ohne Einfluss <i>cis</i> - und <i>trans</i> -aktiver HI-viraler Elemente) .....	110
Schlußfolgerung.....	110
E.3. Bedeutung des Kodongebrauchs für die Genexpression von HI-viralen GFP-Konstrukten und für den nukleären Export der HI-viralen GFP-RNA (unter und ohne Einfluss <i>cis</i> - und <i>trans</i> -aktiver HI-viraler Elemente) .....	111
Schlußfolgerung.....	112
E.4. Bedeutung des Kodongebrauchs für die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen von HI-viralen chimären Provirus-Konstrukten.....	112
IRES („ <i>Internal Ribosome Entry Site</i> “) .....	113
E.4.1. Bedeutung des Kodongebrauchs chimärer HI-Proviren für die Expression und Partikelbildung.....	113
E.4.1.1. Protein-Expression der chimären HI-Proviren.....	113
E.4.1.2. RNA-Stabilität und RNA-Verteilung nach Transfektion mit den chimären HI-Proviruskonstrukten .....	115
E.4.1.3. Schlußfolgerung .....	117
E.4.2. Bedeutung des Kodongebrauchs der chimären HI-Proviren für die Infektiösität der gebildeten Viruspartikel .....	117



Schlußfolgerung.....	118
E.4.3. Bedeutung des Kodongebrauchs der chimären HI-Proviren für die zeitlich regulierte Replikation .....	118
Schlußfolgerung.....	122
E.5. Ausblick .....	122
E.5.1. Analyse der Bedeutung von Sam68 bei der Expression später HIV-1 Produkte .....	122
E.5.2. Herstellung Rev-abhängiger Reporterkonstrukte durch gezielte Veränderung der Kodonwahl.....	123
E.5.3. Herstellung attenuierter Lebendimpfstoffe durch Veränderung der Kodonwahl .....	123
<b>F. Anhang .....</b>	<b>125</b>
F.1. Schematische Darstellung von pcDNA3.1(+) mit den Klonierungsschnittstellen für die integrierten <i>gag</i> - bzw. <i>gfp</i> -Konstrukte und für UTR und RRE.....	125
F.2. <i>gag</i> -Reporterkonstrukte .....	125
F. 2.1. Sequenz von <i>wtgag</i> .....	125
F. 2.2. Sequenz von <i>syngag</i> ( <i>chgag</i> ) .....	126
F.3. <i>gfp</i> -Reporterkonstrukte .....	128
F. 3.1. Sequenz von <i>huGFP</i> (S. Kehlenbeck, Diplomarbeit-RIMMH 2000) .....	128
F. 3.2. Sequenz von <i>hivGFP</i> (S. Kehlenbeck, Diplomarbeit-RIMMH 2000).....	128
F. 3.3. Sequenz von <i>DdGFP</i> .....	129
F. 3.4. Sequenz von <i>e1GFP</i> .....	129
F. 3.5. Sequenz von <i>e2GFP</i> .....	129
F. 3.6. Sequenz von <i>e3GFP</i> .....	129
F. 3.7. Sequenz von <i>cuGFP</i> .....	130
F.4. HI-virale, <i>cis</i> -aktive Elemente .....	130
F. 4.1. Sequenz von UTR.....	130
F. 4.2. Sequenz von RRE .....	130
F.5. HIV-1-Proviruskonstrukte .....	131
F. 5.1. Sequenz von pHX10.....	131
F. 5.2. <i>gag</i> -Sequenz von <i>HXsynCla-Spe</i> , <i>HXsynNsp-Spe</i> , <i>HXsynSpe-Apa</i> .....	131
F. 5.3. Sequenz von <i>HXsyngagpol</i> ( <i>HXsyn</i> ) (M. Graf, Doktorarbeit-RIMMH 2000) .....	131
F.6. Überblick über die Anzahl und Art der Spleißstellen in <i>huGFP</i> , <i>hivGFP</i> und <i>DdGFP</i> .....	132
<b>G. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>H. Veröffentlichungen.....</b>	<b>142</b>
H.1. Papers .....	142
H.2. Vorträge .....	142
H.3. Posterpräsentationen.....	143
<b>I. Danksagung .....</b>	<b>144</b>

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die in der Doktorarbeit von Marcus Graf aufgestellte Theorie über die Regulation der späten HIV-1 Expression weiter belegt werden (Marcus Graf, Doktorarbeit-RIMMH, 2000). Er vermutete, dass die Kontrolle der Rev-abhängigen HIV-Transkripte von der Anwesenheit des 5'-SD (Spleißdonor) abhängig und die zelluläre Spleißmaschinerie an dem Kontrollprozeß beteiligt ist. Darüber hinaus konnte er zeigen, dass der 5'-SD zur nukleären Stabilisierung der INS („*instability or inhibitory sequences*“)-haltigen RNA notwendig ist. Demzufolge ist die Kernretention der späten HIV-Transkripte sowohl auf ineffizientes Spleißen, als auch auf die Präsenz AU-reicher (Repressor-) Sequenzen zurückzuführen.

Anhand chimärer *gag*-HIV-Konstrukte, in denen bestimmt Sequenzbereiche an die Kodonwahl von hochexpremierenden Säugetiergenen angepaßt wurden, konnte jetzt weiter dargestellt werden, dass die 5'-Hälfte des *gag*-Genes für die niedrige Pr55<sup>gag</sup>-Expressionsrate mit *wtgag* transfizierten Zellen verantwortlich ist. Es kann hierbei davon ausgegangen werden, dass die Gag-Repression auf einen additiven inhibitorischen Effekt innerhalb der *wtgag*-Sequenz zurückzuführen ist. Desweiteren hat die Stabilität der *gag*-RNA der chimären Konstrukte einen Einfluß auf die Pr55<sup>gag</sup>-Expression. Diese liegt allerdings nicht an dem zugrundeliegenden A/U-Gehalt der *gag*-Plasmide.

Desweiteren wurde bewiesen, dass die Anwesenheit von 5'-SD inhibitorische Sequenzmotive innerhalb von *wtgag* stabilisieren kann, diese Motive aber für ihre starke destabilisierende Wirkung das RR-Element benötigen.

Bei der Charakterisierung der kontrovers diskutierten INS Elemente von *wtgag* konnte gezeigt werden, dass ihre Funktion nicht über die ARE- (*A/U-rich elements*, 5'-UAAAU-3') bzw. hnRNP A1-(5'-UAGGGA-3') Bindestellen vermittelt wird. Ebenso scheidet das klassische Modell der ARE-vermittelte RNA-Degradierung aus. Demzufolge würde die diskutierte Kolokalisierung ungespleißter HIV-1 prä-mRNAs über die Bindung von hnRNP A1 an die ESS („*exonic splicing silencer*“)-Elemente verlaufen. Zudem konnte dargestellt werden, dass die mehrfach beobachtete Beteiligung von SC35 (5'-UGCNGYY-3' bzw. 5'-AGCAG-3') und SF2/ASF (5'-RGAAGAAC-3' bzw. 5'-SRSASGA-3') an der Regulation der späten HIV-Transkripte zumindest nicht über diese vier Motive innerhalb der *wtgag*-RNA vermittelt wird. Anhand weiterer Computeranalysen wurde hier zum ersten Mal beschrieben, dass in der Studie von Schneider aus dem Jahr 1997 alle Sam68 (68-kDa *Scr-associated substrate during mitosis*) (5'-UAAA-3')-Bindestellen in der *wtgag*-Sequenz zerstört wurden (Schneider *et al.*, 1997). (Mit dieser Arbeit gelang es Schneider damals, die Lokalisierung der INS Elemente in *wtgag* einzugrenzen.) Bemerkenswert ist hierbei, dass man von Sam68 vielseitige Funktionen kennt: Es ist Bestandteil der SNBs („*Sam68 nuclear body*“) und kann beim Spleißen, Export und Translation kontrollierend eingreifen. Mittlerweile wurde ihm immer wieder eine Rolle bei der post-transkriptionalen Regulation von HIV-1 zugesprochen. Eine Aussage darüber, inwieweit Sam68 hierbei wirklich von Bedeutung ist, kann aber allein auf Computeranalysen nicht gemacht werden. Demzufolge werden in der Diskussion nur theoretische Modelle über die Wirkungsweise von Sam68 bei der Rev-abhängigen Expression aufgestellt.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die gestörte Funktion von Rev in murinen Zellen auf den Zelltyp und auf Faktoren zurückzuführen sind, die am 5'-Ende der *gag*-RNA binden.

Um zu bestätigen, dass sowohl der 5'-Hauptspleißdonor als auch der A/U-Reichtum der HIV-Transkripte die minimalen Voraussetzungen für ihre Kernretention und die Rev-abhängige Expression darstellen, wurden in der vorausgegangenen Diplomarbeit von Sylvia Kehlenbeck ein GFP-Reporterkonstrukt entworfen, welches in seinem Kodongebrauch an den des HIV-1 Genoms (*hivGFP*) angepaßt wurde (Sylvia Kehlenbeck, Diplomarbeit-RIMMH, 2000). In Transfektionsstudien erwies sich die *hivGFP*-RNA in Anwesenheit des 5'-SD als stabil im Zellkern und konnte nach Bereitstellung des Rev/RRE-Systems auch im Zytoplasma nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, inwieweit „kryptische“ Spleißdonoren als CRS („*cis-acting repressor sequences*“) die Rev-Abhängigkeit viraler RNAs bestimmen und bei der Regulation der *hivGFP*-Expression zum Tragen kommen, wurde in der vorliegenden Doktorarbeit ein Plasmid entworfen, indem - so weit wie möglich - sowohl alle internen „konsensus“ als auch alle „kryptischen“ Spleißdonoren innerhalb von *hivGFP* mutiert wurden (*DdGFP*). Anhand dieser Studie konnte dargestellt werden, dass „kryptische“ Spleißdonoren nicht für die HIV-typische Abhängigkeit der Genexpression von *hivGFP* (Anwesenheit der *cis*- (UTR, RRE) und *trans*-aktiven (Rev) Elemente) verantwortlich sind.

Mit einer weiterführenden Studie konnte hier nun gezeigt werden, dass auch nicht der reine A/U-Gehalt der Transkripte für die Regulation während der HI-viralen Genexpression ursächlich ist. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass die Replikation von HIV auch anhand von definierbaren, bisher aber kaum charakterisierten, *cis*-aktiven Elementen reguliert wird. Es kann nur vermutet werden, dass es sich hier um die RNA-Bindemotive von Sam68 (5'-UAAA-3') handelt.

In Analogie zu den chimären *gag*-Konstrukten, wurden desweiteren drei chimäre HI-Proviruskonstrukte erzeugt, in denen bestimmte Sequenzbereiche innerhalb des *gag*-Genes an die Kodonwahl von hochexpremierenden Säugetiergenen angepaßt wurden. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals im proviralen Umfeld gezeigt werden, dass Sequenzmodifikationen am 5'-Ende des HI-viralen Genoms einen Einfluß auf die Virusreplikation haben. Der gestörte Vermehrungszyklus der chimären Proviren korreliert dabei mit einer zum Wildtyp andersartigen RNA-Synthese, als auch unterschiedlicher RNA- und Protein-Prozessierung, obwohl nur die Nukleinsäuresequenz variiert wurde und nicht die daraus resultierende Aminosäuresequenz. Die niedrige Expressionsrate der späten HIV-Gene der 5'-kodonmodifizierten Proviren kann dabei auf RNA-Ebene zurückgeführt werden. Inwieweit Sam68, ESE („*exonic splicing enhancer*“), ESS und Tat zur schwachen Konzentration der RNA beitragen wird in einem theoretischen Modell in der Diskussion erläutert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass HI-Provirusmutanten, die am 5'-Ende Sequenzmodifikationen beinhalten, nicht mehr nachweisbar replizieren können. Dies kann (i) auf eine fehlerhafte Prozessierung von Gag, die zu einem gestörten bzw. keinem Einbau von Env in die korrespondierenden Viruspartikel führt, basieren, (ii) auf das Fehlen des *trans*-aktiven viralen p40-Proteins begründet liegen und/oder (iii) auf eine gestörte reversen Transkription zurückgeführt werden. Der chimäre Provirus mit der kodonoptimierten Sequenz am 3'-Ende von *gag* zeigt gegenüber zum Wildtyp eine nur leicht verzögerte Replikation mit einer reduzierten p24-Produktion. Damit steht dieser Provirus unter keinem Selektionsdruck, weshalb bei ihm auch keine manifestierte Rückmutation zur Wildtyp-Sequenz zu beobachten war.

Insgesamt wird durch diese Studie die Hypothese gestützt, dass *cis*-aktive RNA Elemente im Leserahmen von *gag* und/oder *gagpol* von HIV einen Einfluß auf die RNA-Prozessierung, -Stabilität und -Export als auch Virusreifung haben.

Die Ergebnisse dieser Studie können hilfreich sein, einen in seiner Virulenz eingeschränkten HI-Provirus zu erzeugen, der die Grundlage für die Produktion attenuierter Lebendimpfstoffe darstellt.

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
<b>A</b>	
A	Ampere
aa.	Aminosäure ( <i>aminoacid</i> )
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom ( <i>aquired immunodeficiency syndrome</i> )
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	<i>A/U-rich element</i>
AS	Aminosäure
ASF/SF	<i>arginin/serin-rich non-snRNP splicing factors</i>
<b>B</b>	
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	
CA	<i>capsid protein</i>
ca.	circa
CaHPO <sub>4</sub>	Calciumphosphat
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CDR	<i>complementarity-determining regions</i>
<i>chgag</i>	chimäres gag-Konstrukt
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>
Crm-1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
CRS	<i>cis-acting repressor sequences</i>
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T-lymphocytes</i> )
<b>D</b>	
Da	Dalton
DAB	Diaminbenzoid
<i>dam</i>	dam-Methylase (Methylierungsdefekt in <i>E. coli</i> )
<i>dcm</i>	dcm-Methylase (Methylierungsdefekt in <i>E. coli</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Mod Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
ds	<i>double stranded</i> (doppelsträngig)
DTT	Dithiothretiol
<b>E</b>	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enzym chemolumineszenz</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titrplex III)
eIF-5A	<i>eukaryotic initiation factor 5A</i>
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i>
Env	<i>envelope</i> (Hüllprotein)
ESE	<i>exon splicing enhancer</i>
ESS	<i>exon splicing silencer</i>
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<b>F</b>	
f	<i>forward</i> (Kurzbezeichnung für einen 5'-Primer)
F	Fragment

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

FKS	fötales Kälberserum
<b>G</b>	
Gag	gruppenspezifischen Antigen
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gp	Glykoprotein
<b>H</b>	
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore Anlage
HAART	<i>highly active antiretroviral therapy</i>
HeBs	HEPES <i>buffered saline</i>
HIV-1/2	Humanes Immunschwäche-Virus Typ 1/2
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
hnRNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HRP	<i>horse-radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>I</b>	
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
INS	<i>inhibitory or instability sequences</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
<b>K</b>	
Kana	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
kD	Kilodalton
<b>L</b>	
l	Liter
lac <sup>-</sup>	Defekt im Lactose-Operon von <i>E. coli</i>
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LI	<i>Linker</i> protein
Lsg.	Lösung
LTR	<i>long terminal repeat</i>
<b>M</b>	
M	<i>main</i>
M	Molar (Mol pro Liter)
MA	Matrix-Protein
mA	Milliampere
MCS	<i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
MeOH	Methanol
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex ( <i>major-histocompatibility complex</i> )
min	Minute
ml	Milliliter
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MRC	<i>Medical Research Council, UK</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger</i> )
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein</i>
MW	Molekulargewicht oder Mittelwert
<b>N</b>	
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
N	<i>new</i> oder <i>non-M, non-O</i>
NaAc	Natriumacetat
NBT	<i>4-Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NC	<i>nucleocapsid</i>
Nef	<i>negative regulator</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
NNRTI	Nicht-Nukleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren
NPC	<i>nuclear pore complex</i> (Zellkernporenkomplex)
NRTI	Nukleosid / Nukleotid Reverse Transkriptase Inhibitoren

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NTF-2	<i>nuclear transport factor 2</i>
NTR	<i>non translated region</i> (auch als UTR bezeichnet)
Nup	<i>nuclear pore proteins</i> (Zellkernporenproteine)
<b>O</b>	
O	<i>outlier</i>
O. D.	Optische Dichte
OPD	Orthophenylendiamin-HCL
<i>ori</i>	<i>origin of replication</i>
<b>P</b>	
p	Protein
PABP1	<i>poly(A)-binding protein 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Primerbindestelle
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pen	Penicillin
Pfu	DNA-abhängige DNA-Polymerase mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität aus
pH	pH-Wert (Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung)
PI	Protease Inhibitoren
POD	Peroxidase
Pol	Polymerase
poly(A)	Kurzbezeichnung für polyadenyliertes 3'-Ende von RNA-Transkripten
PR	Protease <i>Pyrococcus furiosus</i>
<b>R</b>	
r	<i>reverse</i> (Kurzbezeichnung für einen 3'-Primer)
RanGAP1	<i>RanGTPase activating protein 1</i>
Rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
RHA	<i>RNA helicase A</i>
RIMMH	Regensburger Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene
Rip/Rab	<i>Rev-interacting protein/Rev-activation domain binding protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
<b>S</b>	
SA	Spleißakzeptor
Sam68	<i>68-kDa Scr-associated substrate during mitosis</i>
SC35	<i>splicing component 35</i>
SD	Spleißdonor
SDS	Natrium Dodecylsulfat ( <i>sodiumdodecyl sulfate</i> )
sek	Sekunde
SHIV	HIV-1/SIV-chimäres Virus
SIV	Affen-Immundefizienz Virus
SNB	<i>Sam68 nuclear body</i>
sog.	sogenannt
SR	<i>arginin/serin-rich non-snRNP splicing factors</i>
ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
St.Abw.	Standardabweichung
Strep	Streptomycin
SU	<i>surface</i>
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>tat activating region</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TCID	<i>tissue culture infectious dosis</i>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TE	Tris -EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen
TM	Transmembranprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 ( <i>Tween-Tris Buffered Saline</i> )
U	
U	<i>Units</i> (Enzymeinheit)
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
ÜN	über Nacht
U-snRNP	<i>uracil-rich small nuclear ribonucleoproteins</i>
UV	Ultraviolett
V	
V	Volt
V3	dritte variable Domäne des äußeren Hüllproteins HIV-gp120 <sup>env</sup>
vgl.	Vergleich
Vif	viraler Infektiositätsfaktor
VLP	Virus-ähnlicher Partikel ( <i>virus-like particle</i> )
Vpr	virales Protein R
Vpu	virales Protein U
Vpx	virales Protein X
W	
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>world health organisation</i> )
wt	Wildtyp
X	
XPO	exportin 1 (= Crm-1)
Z	
z. B.	zum Beispiel

## DNA-Basen

<b>A</b>	<b>Adenin</b>	Y	C oder T	W	A oder T
<b>C</b>	<b>Cytosin</b>	R	A oder G	S	G oder C
<b>G</b>	<b>Guanin</b>	K	T oder G	D	A oder G oder T
<b>T</b>	<b>Thymin</b>	M	C oder A	N	unbekannt

## Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
C	Cystein	F	Phenylalanin
E	Glutaminsäure	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
D	Asparaginsäure	Z	Valin



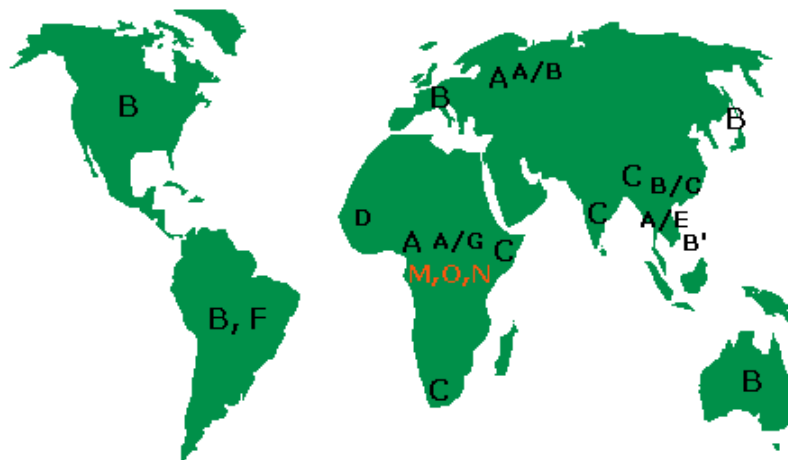
## A. Einleitung

### A.1. Epidemiologie, Ursprung, Genomaufbau und Vermehrungszyklus von HIV-1

#### A.1.1. Epidemiologie

Die ersten Berichte über Fälle des erworbenen Immunschwächesyndroms (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS) stammen aus dem Jahre 1981. 1983 wurde der AIDS-Erreger von zwei Arbeitsgruppen isoliert und identifiziert (erstmalig von Luc Montagnier am Institut Pasteur in Paris, dicht gefolgt von Robert Gallo am National Cancer Institut in Bethesda, USA): das sogenannte menschliche Immunschwächevirus (*human immunodeficiency virus*, HIV), welches der Familie der Retroviridae zugeordnet wurde. Mittlerweile kennt man mindestens zwei Typen des HI-Virus, deren Genome zu etwa 40% übereinstimmen: HIV-1 und HIV-2. HIV-1 wird in drei Gruppen eingeteilt: **M** (*main*) - weltweit verbreitet und beinhaltet derzeit die Subtypen A, B, C, D, E, F, G, H, J und K, **N** (*new* oder *non-M*, *non-O*) - aus zwei Menschen in Kamerun identifiziert, und **O** (*outlier*) - bisher in Kamerun, Gabon und Äquatorial-Guinea vorkommend (Moore *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 1999).

HIV-2 ist in Westafrika endemisch und inzwischen auch in Indien verbreitet. Weltweit werden jedoch die meisten AIDS-Fälle von dem virulenteren HIV-1 verursacht. Das Spektrum an Virusvarianten wird aber noch durch das Auftreten von sog. Mosaikviren erweitert. In Regionen, in denen mehrere Virusvarianten kozirkulieren, kann es nach gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit unterschiedlichen Subtypen zum Auftreten dieser chimären Viren kommen (Carr *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 1995).



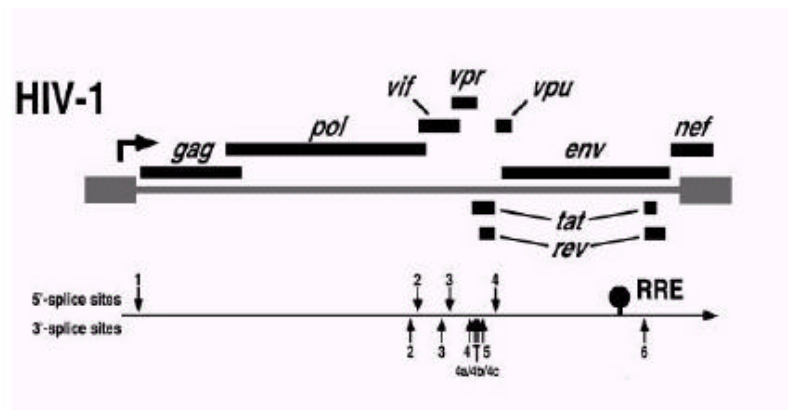
**Abbildung A.-1. Graphische Darstellung der Subtypenverbreitung von HIV-1 und den Mosaikviren.** Die Abbildung entstammt aus der Homepage des RKI-Institutes, Berlin (<http://www.rki.de> - Projektgruppe Retroviren (P22)).

#### A.1.2. Ursprung

Die HIV-1 Epidemie lässt sich nach neuesten Erkenntnissen auf Viren zurückführen, die von Affen auf Menschen übertragen wurden. Es wurden SIV (*simian immunodeficiency virus*) - Stämme vom gemeinen Schimpansen (*Pan troglodytes*) isoliert und identifiziert, die genetisch mit HIV-1 eng verwandt sind (SIVcpzGab1 (Huet *et al.*, 1990), SIVcpzUS (Gao *et al.*, 1999) und SIVcpzCam3 (Corbet *et al.*, 2000)). Das geographische Vorkommen von *Pan troglodytes* entspricht den Gebieten in Zentralafrika, in denen seit 1997 auch HIV-Varianten der Gruppen N und O nachgewiesen wurden. Ebenfalls aus diesem Gebiet

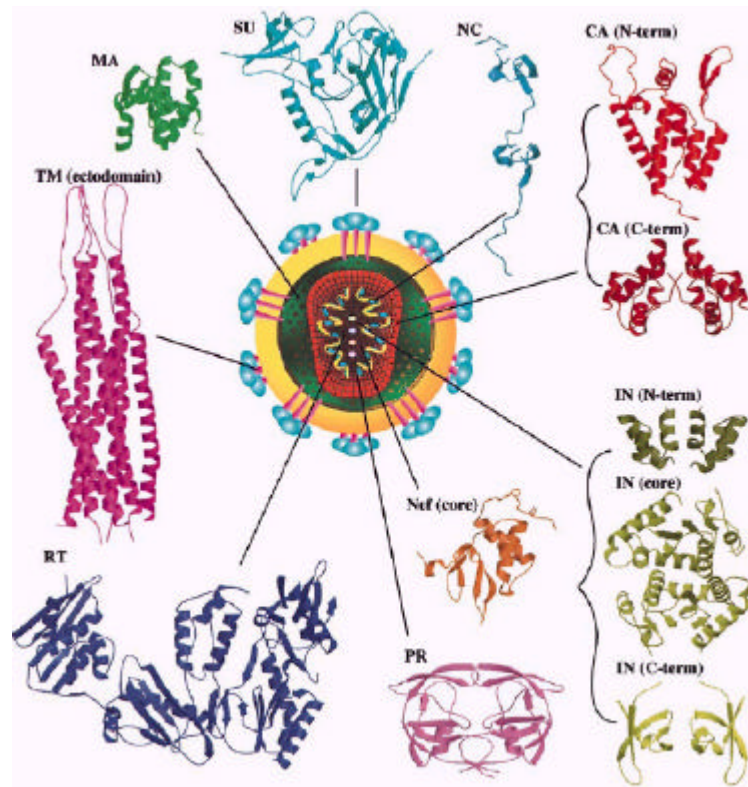
stammt die erste bekannte HIV-Infektion aus dem Jahre 1959. Nach neueren Berechnungen wird die erste Übertragung vom Affen auf Menschen (sog. *Zoonose*) auf das Jahr 1930 datiert. Der wahrscheinlichste Übertragungsweg war damals - wie auch im Falle von HIV-2 angenommen werden muß - Jagd, Zubereitung und Verzehr von Affenfleisch. Zunehmende Motorisierung und Mobilität Mitte der 70er Jahre führten vermutlich dann zum Ausbruch von HIV-1 aus einem Endemiegebiet (Weiss *et al.*, 1999; www.hiv-net.de).

## A.1.3. Genomaufbau



**Abbildung A.-2. Graphische Übersicht über den Genomaufbau von HIV-1 und der Lokalisation der 5'- und 3'-Spleißstellen.** *gag*: gruppenspezifisches Antigen, *pol*: Polymerase, *vif*: viraler Infektiositätsfaktor, *vpr*: virales Protein R, *vpu*: virales Protein U, *tat*: Transaktivator der Transkription, *rev*: Regulator der Expression viraler Proteine, *env*: Envelope, *nef*: negativer Faktor, *RRE*: Rev-responsive element (verändert nach: Pollard & Malim, 1998).

Wie alle Retroviren hat auch HIV-1 (Unterfamilie Lentiviren) ein einzelsträngiges (+)-RNA-Genom, das von langen Wiederholungssequenzen (*long terminal repeats*, LTR) flankiert ist und mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung alle Charakteristika einer eukaryontischen mRNA aufweist. Die LTR-Sequenzen sind für die Integration in das Genom der Wirtszelle und die Regulation der viralen Gene wichtig. An eine als Primer-Bindungsstelle (PB) bezeichnete Sequenzfolge von 18 Nukleotiden im 5'-Bereich des Genoms kann ein Molekül zellulärer tRNA<sup>Lys</sup> hybridisieren, welches als Startnukleotid bei der Reversen Transkription dient. Das Genom kann in drei unterschiedlichen Leserahmen abgelesen werden, und einige der viralen Gene überlappen in den verschiedenen Rastern. So kodiert das Virus in einem relativ kleinen Genom (ca. 9 kb) viele Proteine. Die drei wichtigsten Proteine Gag, Pol und Env werden in allen infektiösen Retroviren gebildet. Daneben besitzt HIV-1 weitere Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren. Sie bestehen häufig aus mehreren Exons und werden von mehrfach gespleißten mRNA-Spezies translatiert. Die Genprodukte von *gag* (**g**ruppenspezifische **A**ntigene), *pol* (**P**olymerase) und *env* (**E**nvelope) sowie zwei virale RNA-Genome sind in den reifen Viruspartikel enthalten (Überblick: Tang, Kuhen & Wong-Staal, 1999; Modrow & Falke, 1997).



**Abbildung A.-3. Aufbau des HIV-1 Viruspartikels.** Die infektiösen Partikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm. Im Inneren des Partikels findet man das konische Capsid. Es besteht aus den Capsidproteinen (CA, p24) und enthält zwei virale RNA-Genome, die im Komplex mit den Nukleocapsidproteinen (NC, p7) vorliegen und alle Charakteristika einer zellulären mRNA haben. Das Capsid ist von einer Hüllmembran umgeben, welche die externen und die transmembranen Glykoproteine (SU, gp120 und TM, gp41) enthält, welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die Innenseite der Membran wird von einer Schicht von Matrixproteinen (MA, p17) ausgekleidet, die über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden sind. Das Link-Protein (p6) verbindet das Capsid mit der Membran. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Viruspartikel die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR). Nef: negativer Faktor (verändert nach: Turner und Summers, 1999).

#### A.1.4. Vermehrungszyklus

### *Frühe Phase der Replikation*

Die Bindung der HI-Viren an ihre Zielzellen erfolgt durch eine spezifische Interaktion zwischen dem als Trimer vorliegenden viralen Oberflächenprotein gp120 (SU) (über die C3-Region) mit den amino-terminalen Domänen (CDR2 und CDR3, *complementarity-determining regions*) von insgesamt drei zellulären CD4-Molekülen. Dadurch wird eine konformationelle Umlagerung im gp120 ausgelöst, die jeweils zur Exposition der Chemokin-Korezeptor-Bindungsstelle (V3-Region) führt. In Abhängigkeit des Virustyps und des Infektionsstadiums dienen die Chemokinrezeptoren CCR5 („*M-tropic strains*“ während der Primärinfektion und der asymptomatischen Phase von AIDS; befallen v.a. Makrophagen) und CXCR4 („*T-tropic strains*“ im späteren Krankheitsverlauf von AIDS; befallen v.a. T-Lymphocyten) als Korezeptoren. Durch die Bindung an jeweils drei CD4- und Korezeptor-Moleküle kommt es zu einer Konformationsänderung im viralen Transmembranprotein gp41, welches nicht-kovalent mit dem gp120 verbunden ist, das nun die Fusion der Virushülle mit der

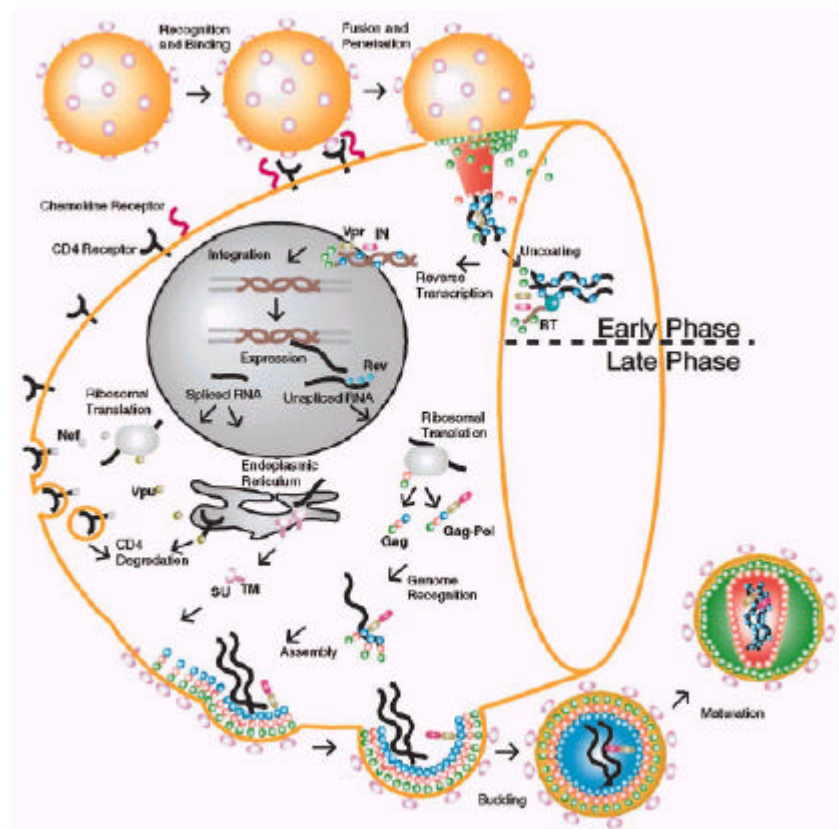
Wirtszellmembran einleitet. Dabei wird das Virus-*Capsid* in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Nachdem das *Capsid* aufgelöst („*uncoating*“) wurde, erfolgt die reverse Transkription des viralen einzelsträngigen RNA Genoms durch die virale Reverse Transkriptase (RT) in eine doppelsträngige DNA. Nachdem diese vollständig in einem aufwendigen Vorgang mit mehrfacher Matrizenwechsel synthetisiert wurde, formiert sich der Präintegrationskomplex (PIC), der neben der viralen DNA aus den viralen Proteinen MA (Matrixprotein) und Vpr (virales Protein R), den viralen Enzymen IN (Integrase) und RT sowie einigen zellulären Proteinen, wie z.B. HMG I (Y) besteht. Hierbei haben MA und IN sogenannte NLS (*nuclear localization sequences*) - Sequenzmotive, die den Import des PIC in den Kern vermitteln. Dabei muß der PI-Komplex eine Distanz von etwa 20 µm von der Plasmamembran zur Kernhülle, wahrscheinlich energieabhängig entlang an Mikrotubulis bewältigen. Vpr greift direkt an der Kernpore bei der Translokation ein, indem es mit den dort ansässigen Nukleoporinen interagiert. Diese Interaktion von Vpr ist aber ebenso wie das Vorhandensein von MA nicht essentiell. PIC befähigt somit HIV im Gegensatz zu anderen Retroviren unabhängig von der Zellteilung und der damit einhergehenden Kernmembranauflösung auch ruhende, in der Interphase befindliche Zellen zu infizieren. Im Kern angekommen wird die virale DNA durch die virale Integrase (IN) an einer willkürlichen Stelle im Wirtsgenom integriert. Dadurch kommt es zu einer Verdoppelung der Zielsequenz, welche somit die integrierte, provirale DNA flankiert. Die Integration der viralen Erbinformation verändert somit das Zellgenom. Abhängig von der Lage des Ereignisses können zelluläre Gene zerstört werden, oder sie gelangen unter die Kontrolle des 3'-LTR-Promoters und werden durch ihn aktiviert (Überblick: Turner & Summers, 1999; Sherman & Greene, 2002; Tang, Kuhen & Wong-Staal, 1999).

## ***Späte Phase der Replikation***

Die späte Phase des Replikationszykluses ist durch eine zunächst sehr ineffiziente Expression der viralen Gene gekennzeichnet. An die U3-Region des LTR binden verschiedene zelluläre Faktoren (z.B. NF-κB und Sp1), welche die Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II ermöglichen; - allerdings bricht diese meist nach dem TAR-Element (*trans-activating response element* oder *tat recognition site*), einer 59 Nukleotide (nt) umfassende Sequenzfolge direkt am Transkriptionsstart im LTR, wieder ab. Zu einem geringen Prozentsatz kommt es aber doch zu einer Produktion einer mehrfach gespleißten mRNA, von der im Zytoplasma unter anderem das Tat (*transcriptional activator of transcription*) Protein translatiert wird. Nachdem Tat aufgrund seiner NLS-Sequenz in den Kern transportiert wurde, bindet es an die ausgebildete Stammstruktur des TAR-Elementes und rekrutiert das zelluläre Protein Cyclin T und die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9 (Cdk9) heran. Dadurch bildet sich ein heterotrimerer Komplex aus Tat, Cyclin T und Cdk9 aus. Als Bestandteil dieses Komplexes hyperphosphoryliert Cdk9 die carboxyl-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II. Dadurch kann sich die Polymerase effizient vom Promoter freisetzen, und es kommt zu einer probaten Elongation.

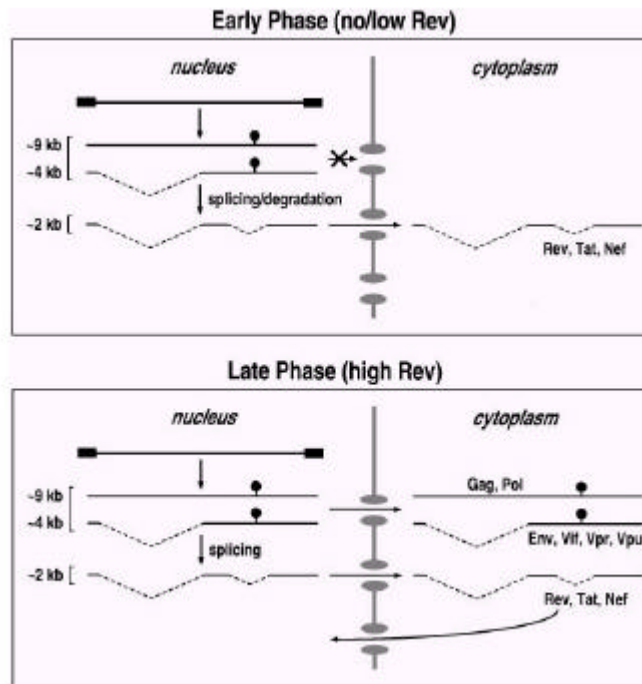
Wie bereits erwähnt, werden in der ersten Phase der Transkription mehrfach gespleißte RNAs generiert. Ungespleißte prä-mRNAs werden aufgrund ineffizienter bzw. „kryptischer“ Spleißdonor (SD)- und Spleißakzeptor (SA)-Stellen im Zellkern zurückgehalten, wo sie weiter prozessiert oder degradiert werden (O'Reilly *et al.*, 1995) (siehe Kapitel A.2.). Die nukleäre Degradierung ungespleißter, viraler RNA-Transkripte

wird auf bislang noch unbekannte Weise durch - zum Teil kontrovers diskutierte - *cis*-aktive A/U-reiche Sequenzmotive vermittelt (Cochrane *et al.*, 1991; Maldarelli *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1992 a, 1992 b; Schneider *et al.*, 1997) (siehe Kapitel A.2.). Durch diesen Regulationsmechanismus werden zunächst ausschließlich mehrfach gespleißte virale RNA-Transkripte aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Diese kodieren neben Tat auch für das Regulatorprotein Rev. Rev besitzt ebenfalls eine NLS-Sequenz, die seinen Kerntransport vermittelt. Um als Regulatorprotein agieren zu können, benötigt Rev ein 351 nt langes RNA Element (RRE; *Rev responsive element*), welches im viralen *env* Gen lokalisiert und somit in den mRNAs vorhanden ist, welche für die viralen Struktur (Gag, Pol, Env)- und Hilfs (Vif, Vpr, Vpu)-Proteine kodieren. Nachdem mehrere Rev Proteine an das RR-Element unter Ausbildung eines Ribonukleoprotein(RNP)-Komplexes gebunden haben, bewirken sie aufgrund ihrer ebenfalls vorhandenen NES (*nuclear export signal*)-Sequenz den Export dieser mRNAs durch die Kernporen (im Detail siehe Kapitel A.2.). Im Zytoplasma erfolgt dann die Dissoziation des Komplexes unter Freisetzung der viralen mRNA, wobei Rev aufgrund seiner NLS-Sequenz wiederum in den Zellkern transportiert wird. Auf diese Weise wirkt Rev als Schalter zwischen der frühen Erzeugung mehrfach gespleißter mRNAs (ca. 2 kb: Tat, Rev, Nef) und der späten Synthese von einfach gespleißten (ca. 4 kb: Env, Vif, Vpr, Vpu) bzw. ungespleißten mRNAs (ca. 9 kb: Gag, Gag/Pol, RNA-Genom).



**Abbildung A.-4. HIV-1 Replikationszyklus.** Die „frühe Phase der Replikation“ beginnt mit der CD4-Erkennung und beinhaltet alle Ereignisse bis zur Integration der proviralen DNA in das Wirtsgenom. Von der „späten Phase der Replikation“ spricht man ab der Transkription der integrierten DNA bis zur Virus Freisetzung („budding“) und Reifung („maturation“) (verändert nach: Turner und Summers, 1999).





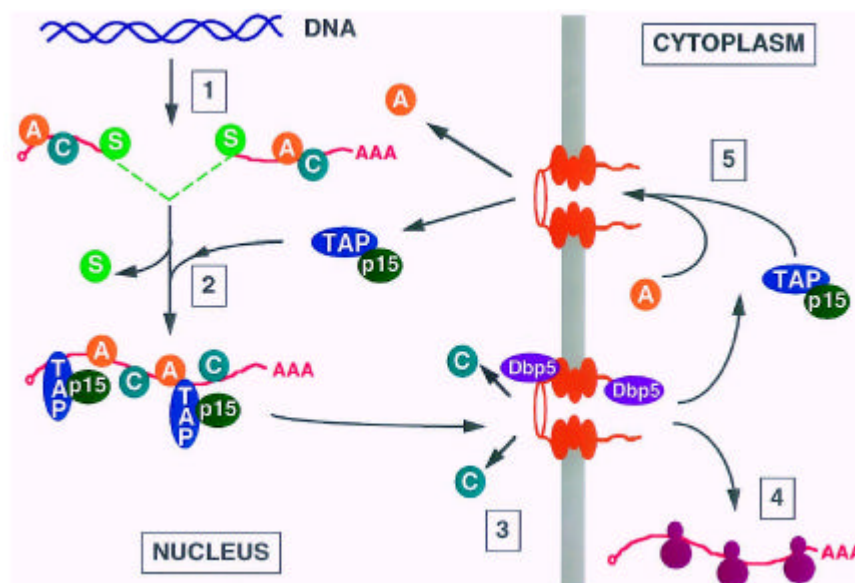
**Abbildung A.-5. Rev-abhängige Expressionskinetik der HI-viralen Transkripte.** Schematische Darstellung der subzellulären Verteilung der HIV-1 Transkripte in der frühen Phase der Transkription (wenig, kein Rev vorhanden - oben in der Abbildung), sowie in der späten Phase der Transkription (viel Rev vorhanden - unten in der Abbildung). ~9 kb: ungespleißte RNA, ~4 kb: einfach gespleißte RNA, ~2 kb: mehrfach gespleißte RNA (verändert nach: Cullen, 1998).

Die Synthese der Env-Proteine (gp160) verläuft an der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER), infolge dessen sie glykosyliert werden. Die Aktivität der mit der ER-Membran assoziierten viralen Vpu-Proteine verhindert dabei, dass die Env-Proteine vorzeitig mit den CD4-Rezeptoren wechselwirken, die ebenfalls im ER produziert werden. Im Verlauf des Transports über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche kommt es zur Spaltung des gp160-Vorläufermoleküls in gp120 (SU, *surface*) und gp41 (TM, *transmembran*) und zur Ausbildung des trimeren (TM-SU)<sub>3</sub>-Komplexes. Die Translation aller anderen Virusproteine erfolgt an freien Ribosomen im Zytoplasma. Die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine - letztere entstehen aufgrund eines seltenen (ca. 5%) Leseraster-sprungs während der Transkription - werden während ihrer Synthese myristyliert und mit Hilfe zellulärer Faktoren zur Zellmembran transportiert, an die sie sich anlagern. Nachdem sich etwa 2000 Gag Kopien und bis zu 100 Kopien des Gag/Pol-Vorläuferproteins an die Plasmamembran zu den dort mittlerweile ebenfalls vorhandenen Env-Proteinen angeordnet und mit diesen interagiert haben, kommt es - allerdings erst nach Bindung zweier viraler RNA-Genome an den Nukleocapsidanteil (NC) im Gag - zur Ausknospung unreifer Viruspartikel. Unklar ist hierbei immer noch, wie sichergestellt wird, dass immer nur zwei RNA-Genome an die NC-Bereiche angelagert und in die entstehenden Partikel verpackt werden. In dem entstandenen unreifen Viruspartikel liegt aufgrund der Aminosäure-zusammensetzung der Virusproteine ein leicht saurer pH-Wert von 6,0 bis 6,2 vor, der allerdings für die autokatalytische Spaltung der Protease aus ihrem Vorläuferprotein (Gag/Pol) optimal ist. Die so freigesetzte Protease kann nun aus den Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteinen die Matrix-, Capsid-, Nukleocapsid- und Link-Proteine herauspalten

sowie die Reverse Transkriptase und die Integrase. Dieser als *Maturation* (Reifung) bezeichnete Prozess beinhaltet gleichzeitig strukturelle Umlagerungen unter Ausbildung des konischen *Capsids*. Die Morphogenese zu infektiösen Virionen ist nun abgeschlossen. Durch die Virusvermehrung sterben die infizierten Zellen ab, da dadurch der programmierte Zelltod induziert wird (Überblick: Turner & Summers, 1999; Tang, Kuhen & Wong-Staal, 1999; Modrow & Falke, 1997).

## A.2. Posttranskriptionelle Regulation bei HIV-1 durch Rev

Ein wichtiges Merkmal von Eukaryonten ist, dass ihr Genom im Kern lokalisiert ist und aus Exons und Introns besteht. Die Transkription der DNA in RNA findet im Kern statt, die Translation der mRNA in Protein im Zytoplasma. Deshalb ist ein Transport der mRNA durch die Kernporen notwendig. Dieser Prozess wird bei Säugetieren so streng kontrolliert, dass nur vollständig gespleißte und damit prozessierte mRNAs exportiert werden. Nachfolgende Abbildung gibt einen schematischen Überblick über diese Regulation. Damit Viren, die z.B. ein RNA-Genom haben oder intronlose Gene besitzen, auch in eukaryontischen Zellen replizieren können, mußten sie Wege finden, diese zelluläre Kontrollmaschinerie zu unterlaufen. Im nachfolgenden Abschnitt wird erläutert, welchen viralen Mechanismus HIV-1 dafür benutzt.



**Abbildung A.-6. Postulierter Mechanismus des mRNA-Exportes bei Säugetieren.** Prä-mRNAs werden durch die RNA Polymerase II erzeugt (1) und sehr schnell in sog. Ribonukleoprotein(RNP)-Komplexe assembliert, die verschiedene hnRNPs (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle) (A, C) und Spleißhilfsfaktoren (S) beinhalten. Dieser Komplex ist RNA Exportfaktoren unzugänglich, so dass er im Kern zurückgehalten wird. Nach vollendetem Spleißen werden die Hilfsfaktoren freigesetzt und die mRNA Exportfaktoren inklusive Tap und seinem Kofaktor p15 durch einen unbekannten Mechanismus rekrutiert (2). Danach dockt der RNP-Komplex, der jetzt die reife mRNA beinhaltet, an den Nukleoporinkomplex (NPC, nuclear pore complex) an (3) und verläßt den Kern. Bei diesem Schritt werden nicht zum – zwischen Kern und Zytoplasma - Pendeln fähige hnRNPs (z.B. hnRNP C) durch die Aktivität der NPC-assoziierten RNA Helikase Dbp5 freigelassen. Im Zytoplasma binden RNA-bindende Proteine für die Translation an die mRNA (4), während die zum Pendeln fähigen hnRNPs (z.B. hnRNP A1), sowie die nukleären mRNA Exportfaktoren inklusiv Tap und p15 in den Kern zurückkehren (5) (verändert nach Cullen, 2000).

(Anmerkung: Im Folgenden stammen nicht extra zitierte Nennungen zum Überblick aus einem der folgenden Rev-Reviews: Kjems & Askjaer, 2000; Pollard & Malim, 1998)

## ***Charakteristika von Rev, sein Kernimport ...***

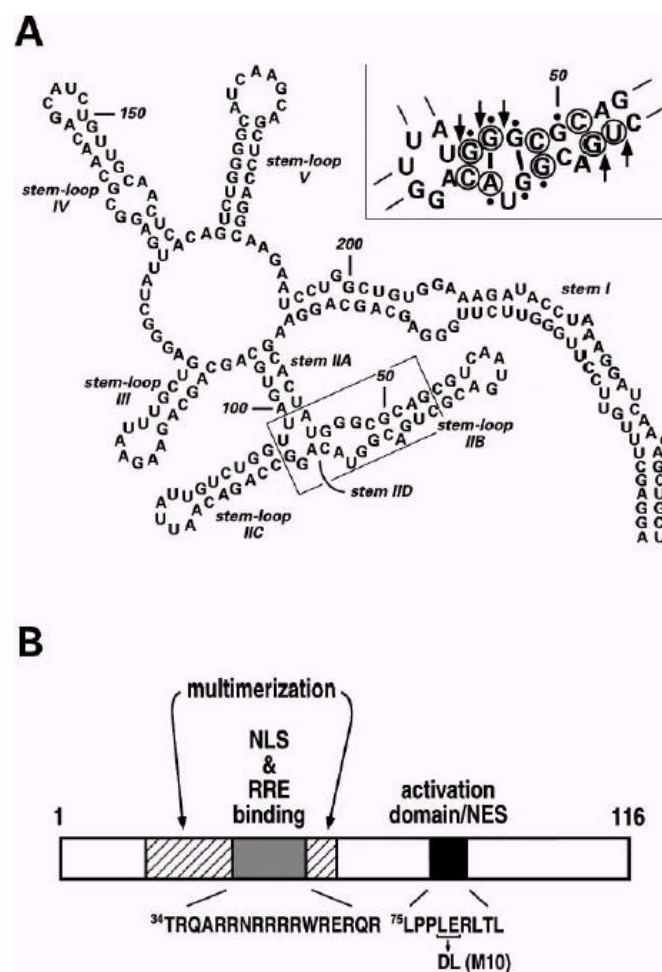
Wie schon erwähnt, vermittelt Rev durch Bindung an RRE den Sequenz-spezifischen Kernexport der ungespleißter und einfach gespleißter HI-viraler mRNA. Das etwa 18 kDa große und 116 Aminosäuren umfassende Phosphoprotein Rev (die Phosphorylierungsstellen sind die Serine 54 und 56) besitzt zwei funktionelle Domänen. Der N-Terminus beinhaltet Sequenzmotive, die wichtig für die nukleare Lokalisation, Multimerisierung und RNA-Bindung sind. Hierbei überlappt die ungewöhnlich Arginin-reiche NLS Sequenz (auch *arginine-rich domain*, ARD genannt) (normalerweise sind zelluläre NLS-Sequenzen Lysin-reich) mit der Bindestelle für das *Rev Responsive Element*. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese NLS Sequenz für den nuklearen Import von Rev direkt Importin- $\beta$  binden kann. Klassischerweise würde Importin- $\alpha$  durch zelluläre NLS gebunden werden, welches die Interaktion mit Importin- $\beta$  dann vermitteln würde (Importin- $\beta$  ist der zelluläre Faktor, der direkt mit dem Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) interagiert). Desweiteren sind für den nukleären Import von Rev noch NTF-2 (*nuclear transport factor 2*) und Ran GTPase notwendig. NTF-2 kann an Nucleoporine, Importin- $\beta$  und RanGDP binden. Man nimmt an, dass es für die Translokation von Rev durch die Kernpore notwendig ist. Die genaue Funktion der Ran GTPase ist bisher unklar. Wahrscheinlich stellt sie zum einen die Energie via GTP Hydrolyse zur Verfügung, zum anderen bestimmt sie die Transportrichtung, indem sie die asymmetrische Verteilung von RanGTP/RanGDP an der Kernmembran aufrecht erhält. An der nuklearen Seite der Kernpore wird der Rev-Importkomplex aufgelöst, nachdem GTP, welches durch RCCI (*Ran guanine nucleotide exchange factor*) aus GDP gebildet wird, an Importin- $\beta$  gebunden hat. Desweiteren konnte B23 (Frankhauser *et al.*, 1991; Szebeni *et al.*, 1995) als NLS-bindendes Protein identifiziert werden. Man vermutet, dass B23 ein Kofaktor von Importin- $\beta$  ist, als auch, dass es als Chaperon die Aggregation der Rev Proteine solange verhindert, bis sie an ihre Ziel-RNA gelangt sind (siehe Abbildungen A.-7. und A.-8).

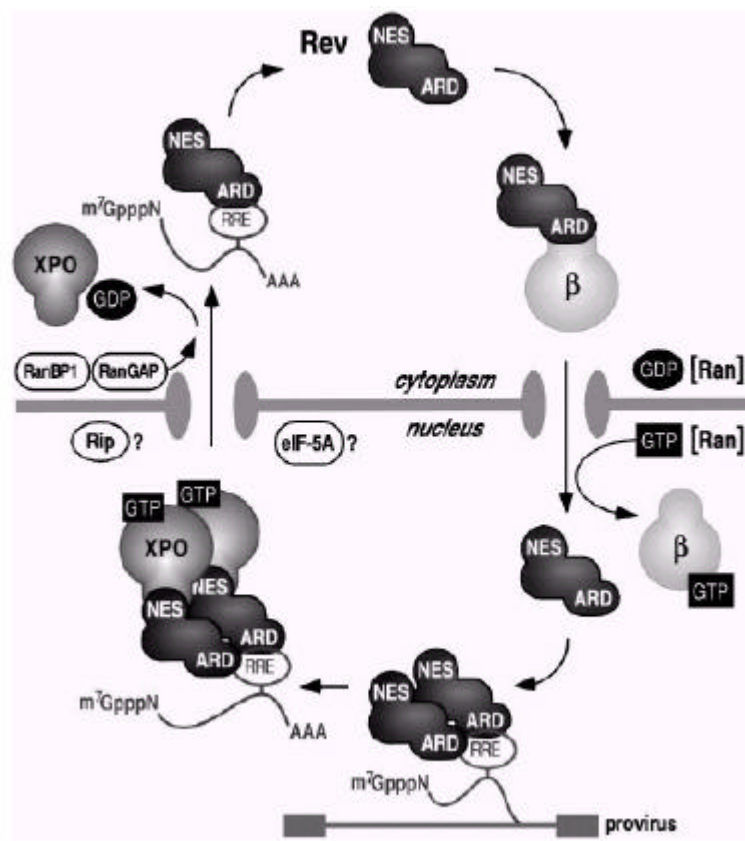
## ***... und Rev-vermittelter Kernexport***

Im C-Terminus von Rev ist das Leucin-reiche nukleare Export Signal (NES, *nuclear export signal*) lokalisiert (siehe Abbildung A.-7.). Das Vorhandensein von NLS und NES befähigt Rev zwischen Zytoplasma und Kern hin und her transportiert („shuttle“) zu werden. Um seine Funktion ausführen zu können, benötigt Rev RRE, welches im *env*-Intron zwischen der 5'-SD-Stelle 4 und der 3'-SA-Stelle 6 lokalisiert ist. RRE weist eine extensive Sekundärstruktur mit mehreren Schleifen auf (siehe Abbildung A.-7.). Die vom 5'-Ende her zweite Schleife von RRE (sog. SLII) ist die Hauptbindestelle, also mit hoher Affinität, für Rev. Nach Bindung eines Rev-Proteins kommt es durch Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen zur Assemblierung weiterer ( $\geq 9$ ) Rev-Proteine an die RRE Sequenz (Najera, Krieg und Karn, 1999). Aufgrund der Tatsache, dass mehrere Rev Proteine notwendig sind, um RRE-haltige RNA zu exportieren, wird die zeitliche Regulation durch Rev erzeugt. Erst wenn genügend Rev Proteine translatiert worden sind, die an RRE oligomerisieren, kann ein Umschalten auf die „späte“ Gen-Expression



erfolgen. Der entstandene Ribonukleoprotein(RNP)-Komplex wird nach Assoziation mit Proteinen des Kernporenkomplexes (z.B. Nup214 und Nup153, „Nucleoporine“) (Fritz *et al.*, 1996; Stutz *et al.*, 1996) anhand eines für HIV spezifischen Exportweges mit Hilfe des zellulären Exportfaktors Crm-1 (*chromosome region maintenance gene 1*, auch - nach Aufklärung seiner Funktion - *exportin 1*, XPO genannt) aktiv durch die Kernporen (Durchmesser ca. 125 MDa) transportiert. Hierbei stellt Crm-1 den Export-Rezeptor für Rev (Bindung an NES) dar, über den sowohl RanGTP gebunden, als auch die Interaktion zu CAN/Nup214 (Fornerod *et al.*, 1997) vermittelt wird. (Crm-1 vermittelt normalerweise den zellulären Export der 5S rRNAs und U1 snRNAs (Fischer *et al.*, 1995).) An der zytoplasmatischen Seite der Kernpore vermitteln RanGAP1 (*RanGTPase activating Protein 1*) und RanBP1/2 (*Ran binding protein 1 and/or 2*) dann die Hydrolyse des Ran-gebundenen GTPs in RanGDP, unter Auflösung des Komplexes.





**Abbildung A.-8. Mechanismus des Rev-vermittelten Exports HI-viraler, später RNAs:** Nach Bindung und Oligomerisierung von Rev an RRE bindet der zelluläre Exportfaktor Crm-1 (XPO) zusammen mit RanGTP an das Kernexportsignal (NES) von Rev. Dieser Komplex wird anschließend aktiv unter Hydrolyse von GTP zu GDP durch die Kernporen in das Zytoplasma transportiert. Nach Auflösung des Export-Komplexes unter Freisetzung der viralen RNA wird Rev, aufgrund seiner Arginin-reichen Kernimportsequenz (NLS oder ARD), direkt von Importin-β gebunden und in den Zellkern importiert (im Detail siehe obige Ausführung; verändert nach Pollard und Malim, 1998).

### Einfluß zellulärer Faktoren beim Rev-vermittelten Kernexport ...

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass für einen erfolgreichen Rev-vermittelten mRNA-Kernexport noch der zelluläre Faktor eIF-5A (*eukaryotic initiation factor 5A*) sowie die Nukleoporin-ähnlichen Proteine Rip/Rab (*Rev interacting protein/Rev activation domain-binding protein*) notwendig sind; - ihre genaue Funktion dabei konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Studien von Bogerd und Bevec weisen darauf hin, dass sowohl eIF-5A, als auch Rip/Rab über NES agieren (Bogerd *et al.*, 1995; Bevec *et al.*, 1996). Kontrovers dazu ist allerdings die Studie von Henderson, der keine NES-abhängige Interaktion zwischen Rev und den Kofaktoren aufzeigen konnte (Henderson *et al.*, 1997). Die 2002 veröffentlichte Arbeit von Yi dokumentiert ebenfalls, dass Crm-1 der einzige zelluläre Exportfaktor ist, der für den Rev-abhängigen Transport RRE-haltiger RNAs benötigt wird (Yi *et al.*, 2002). Allerdings scheint Sam68 (68-kDA *Src-associated protein in mitosis*) für die Translokation des RNP-Komplexes an die Kernpore wichtig zu sein (Li *et al.*, 2002 a). Die Interaktion erfolgt hierbei vermutlich über Bindung von Sam68 an das NES-Motiv von Rev.

## **... und bei der Prozessierung viraler, ungespleißter und einfach gespleißter RNA**

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Rev ist, dass es nur „im Entstehen begriffene“ RNA-Transkripte als Substrate für den Export benutzt (Iacampo und Cochrane, 1996). Ein großer Vorteil dieser Besonderheit ist, dass diese RNA kaum mit dem Spleißosomenkomplex assoziiert ist. Die Funktion von Rev alleine reicht aber nicht aus, das Prozessieren der prä-mRNAs durch das Spleißosom zu unterbinden bzw. bereits mit dem Spleißosomenkomplex assoziierte prä-mRNA freizusetzen. Insofern benötigt HIV-1 auch bei diesem Schritt weitere Hilfsfaktoren. Die bisher Identifizierten sind alle zellulären Ursprungs. Eine wichtige Rolle nimmt hierbei die RNA-Helikase A (RHA) ein, welche in der Zelle die Funktion besitzt, bereits gespleißte mRNA vom Spleißosom freizusetzen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression an RHA die Konzentration RRE-haltiger mRNA im Kern erhöht. Deshalb vermutet man, dass RHA bei der viralen Regulation frühzeitig heranrekruiert wird, um ungespleißte bzw. erst einfach gespleißte virale mRNA von der Spleißmaschinerie freizusetzen (Li *et al.*, 1999). Durch diesen Regulationsweg wird die Erzeugung ungespleißter bzw. einfach gespleißter RNA sichergestellt, welche wiederum den für HIV typischen Genomaufbau (Kodierung von Genen in ungespleißter bzw. einfach gespleißter RNA) erst ermöglicht. Desweiteren ist schon lange bekannt, dass Rev im Kern v.a. in Nukleoli akkumuliert und zum Teil mit dem Spleißfaktor SC35 (*splicing component 35*, auch *non-small nuclear ribonucleoprotein splicing factor* oder *non-small nuclear ribonucleoprotein RNA processing factor* genannt) (ein Mitglied der SR-Proteine) in den Spleißzentren („*nuclear speckles*“) kolokalisiert wird (Kalland *et al.*, 1994 a, 1994 b). 1996 konnten Berthold und Maldarelli zeigen, dass nur ein geringer Anteil der Rev-Proteine in den SC35-haltigen Granula - vor allem an deren Peripherie - lokalisiert ist, der größte Anteil jedoch im oder am Nukleolus zu detektieren war (Berthold & Maldarelli, 1996). Diese Befunde konnten bisher für eine mögliche Erklärung, wie Rev das Spleißen inhibiert, nicht gedeutet werden.

Ferner konnten mittlerweile auch RRE-bindende zelluläre Proteine nachgewiesen werden. So z.B. ein neuer nukleärer Faktor (mit Homologie zu hnRNP F, (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F*)), der *in vitro* mit RRE-haltiger RNA interagiert und wahrscheinlich einen negativen Einfluß auf deren Expression hat (Xu *et al.*, 1996).

Die Familie der hnRNP-Proteine assoziiert mit prä-mRNAs während ihrer Transkription und verbleibt auch nach vollendetem Spleißen an ihnen (Nakielny *et al.*, 1997). Es werden zwei Klassen unterschieden: Die eine besitzen ein „*nuclear export signal*“ und werden deshalb mit der mRNA in das Zytoplasma transportiert (z.B. hnRNP A1), die anderen haben ein „*nuclear retention signal*“ und verbleiben deshalb im Kern (z.B. hnRNP C1/C2) (Pinol-Roma, 1997).

Ebenso bindet der Spleißfaktor SF2/ASF (ein Mitglied der SR-Proteine) *in vitro* Rev-abhängig an das RR-Element; seine Überexpression führt *in vivo* zur Inhibition der Rev-Funktion und der viralen Replikation (Powell *et al.*, 1997). Man vermutet, dass die Interaktion von Rev mit verschiedenen Spleißproteinen - in der „natürlichen“ Umgebung - die notwendige Entfernung der Spleißfaktoren von Intron-haltiger RNA vermittelt.

### ***Cis-aktive Sequenzmotive innerhalb viraler, RRE-haltiger RNA***

All die mittlerweile genannten Mechanismen reichen nicht aus, um die Verteilung zwischen vollständig gespleißter, einfach gespleißter und ungespleißter RNA zu erreichen. Deshalb benutzt HIV weitere Möglichkeiten die Rev-Regulation sicherzustellen. Eine davon ist die Verwendung „suboptimaler“ Spleißakzeptoren(SA)-Stellen. Dazu kommen noch mindestens zwei Arten *cis*-aktiver RNA Signale: Erstere sind *cis*-aktive inhibitorische Sequenzen, die neben den SA-Stellen des ersten und zweiten Exons von *tat* und *rev* lokalisiert sind und deren Spleißrate reduzieren (sog. ESS, *exon splicing silencer*). Zweitere sind bisher kaum charakterisierte A/U-reiche Sequenzmotive, die INS (*instability or inhibitory sequences*) oder CRS (*cis-acting repressor sequences*) genannt werden, in den Genen von *gag* (p17<sup>MA</sup> (Schwartz *et al.*, 1992 a, 1992 b), p24<sup>CA</sup> (Schneider *et al.*, 1997)), *pol* (Cochrane *et al.*, 1991), *env* (Nasioulas *et al.*, 1994) und RRE (Nasioulas *et al.*, 1994; Brighty *et al.*, 1994) vorkommen und unabhängig voneinander agieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der INS-Elemente durch Punktmutationen innerhalb von *gag* zu einem hohen Anstieg der Pr55<sup>gag</sup>-Expression und zur Bildung reifer Partikel in Abwesenheit von Rev führte. Für das INS innerhalb von p24<sup>CA</sup> konnten zusätzlich neben dem hohen A/U-Gehalt auch zwei AUUUA Pentanukleotide identifiziert werden (Schneider *et al.*, 1997).

Es gilt als gesichert, dass der ungewöhnlich hohe A/U-Gehalt bestimmter zellulärer mRNAs (z.B. c-myc, c-fos, c-myc, IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3) für ihre Instabilität und schnelle Degradierung verantwortlich ist (Hentze, 1991). AUUUA-Motive sind für die schnelle Degradation zellulärer GM-CSF mRNAs ursächlich (Shaw *et al.*, 1986). Chen und Shyu nehmen an, dass kurzlebige RNA über eine einleitende Deadenylierung - unter dem Einfluß sowohl ARE (*adenylate/uridylate-rich element*)-bindender Proteine, als auch dem mRNP (*messenger ribonucleoprotein*)-Komplex - Exo- oder Endonukleasen zugänglich gemacht wird (Chen *et al.*, 1995).

Insgesamt sind aber bisher keine Sequenzhomologien zwischen den INS-Elementen bekannt. Es gibt Hypothesen, dass die INS-Elemente Bindestellen für zelluläre Faktoren darstellen, die zur mRNA-Instabilität beisteuern. Afonina *et al.* konnten zeigen, dass das PABP1 (*poly(A)-binding protein 1*) an das INS-Element in p17<sup>MA</sup> bindet. Die Bindung von PABP1 könnte dazu führen, dass die Ribonukleoproteine nicht mehr richtig an die mRNA assoziieren können, oder dass der RNP-Komplex in ein falsches zelluläres Kompartiment transportiert wird (Afonina *et al.*, 1997). Diese Annahme ist im Einklang mit älteren Postulaten, welche vermuten, dass ungespleißte prä-mRNAs aufgrund ihrer sog. inhibitorischen Sequenzen in nukleäre Sub-Kompartimente zurückgezogen werden, wo sie für die Spleißmaschinerie unzugänglich sind. Durch *in situ*-Hybridisierung und konfokale Mikroskopie zeigten 1996 Berthold und Maldarelli, dass man HIV-RNA in zwei distinkten intranukleären Bereichen detektieren kann. Mehrfach gespleißte RNA war in den Spleißzentren mit Kolokalisierung von SC35 nachzuweisen; dagegen war die ungespleißte RNA in kleinen Granula ohne SC35 zu finden (Berthold & Maldarelli, 1996; Chang & Sharp, 1989; Mikaëlian *et al.*, 1996). Kontrovers dazu ist allerdings die Studie von Favaro, der eine Kolokalisierung ungespleißter HI-viraler RNA und SC35-haltiger Granula beobachten konnte, allerdings nur bei Anwesenheit von Rev (Favaro *et al.*, 1998). Unterschiede in den Ergebnissen können eventuell dadurch erklärt werden, dass sowohl verschiedene Zelltypen als auch Fixierprotokolle verwendet wurden. 1999 konnten Najera

*et al.* wiederum im INS-Element von p17<sup>MA</sup> eine Bindestelle für hnRNP A1 identifizieren, welches mit einem 50 kDA großen, zweiten RNA-Bindeprotein einen Komplex bildet.

Es ist bekannt, dass der Spleißfaktor hnRNP A1 die Auswahl der 5' Spleißstellen reguliert und zwischen Kern und Zytoplasma pendeln kann.

Wurde die hnRNP A1-Bindestelle in einem  $\beta$ -Globin RRE-haltigen Reporterkonstrukt eingebaut, so konnte nach Kotransfektion mit Rev, die zytoplasmatische Konzentration dieser ungespleißten mRNA um 14% erhöht werden. Diese Studie läßt deshalb vermuten, dass die Assoziierung von hnRNP A1 ungespleißte prä-mRNAs in einen nukleären Bereich führt, wo sie dann von Rev erkannt und in das Zytoplasma transportiert werden. (Najera *et al.*, 1999). Allerdings können die INS-Elemente nicht alleine den Kernexport ungespleißter mRNA fördern (Mikaëlin *et al.*, 1996). Dies spricht dafür, dass die RR- und INS-Elemente der ungespleißten bzw. einfach gespleißten RNA (sowohl die INS- als auch die RRE-Sequenzen sind bei HIV innerhalb von Introns lokalisiert, die durch Spleißen entfernt werden) synergistisch auf ihren Rev-abhängigen Export wirken.

## ***Wirkung von Rev/RRE im Zytoplasma***

Außerdem markiert die Interaktion von Rev/RRE im Zytoplasma die transportierten Transkripte auch für die Polysome und aktiviert somit die Translationseffizienz. Dies konnte kürzlich dadurch gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Rev mit einer subzellulären Lokalisation viraler Intron-haltiger RNA bei den Polyribosomen korrelierte (Kimura *et al.*, 2000; Boris-Lawrie *et al.*, 2001).

Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass Rev *in vitro* Spleißen inhibieren kann (ndem es den Zusammenbau des Spleißosoms verhindert) (Kjems *et al.*, 1991, 1993), *in vivo* mit den Spleißkomponenten agiert (Luo *et al.*, 1994), den Transport RRE-haltiger RNA vermittelt (Fischer *et al.*, 1994, 1995; Meyer *et al.*, 1994), diese RNA stabilisiert (Felber *et al.*, 1989; Malim *et al.*, 1993) und den Zusammenbau der Polysomen unterstützt (Arrigo *et al.*, 1991). Damit bilden RNA-Synthese, -Prozessierung, -Kernexport und -Translation eine ineinander geschachtelte Kaskade, die für eine geordnete HI-virale Genexpression unabdingbar ist.

## **A.3. Therapieansätze gegen HIV-1 und Anwendungsmöglichkeiten des Rev/RRE-Systems**

### ***Pharmazeutische Therapieansätze***

Die sogenannte hochaktive antiretrovirale Therapie - kurz HAART (*highly active antiretroviral therapy*) - ist gegenwärtig die beste Strategie, die Vermehrung des Erregers maximal zu unterdrücken. Alle Medikamente, die derzeit eingesetzt werden, können dabei pharmakologisch in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden:

- Nukleosid / Nukleotid Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs)  
(z.B. *Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Lamivudine, Stavudine, Abacavir*)
- Nicht-Nukleosid Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs)  
(z.B. *Nevirapine, Efavirenz, Delavirdine*)
- Protease Inhibitoren (PIs)  
(z.B. *Saquinavir, Indinavir, Ritonavir, Nelfinavir, Amprenavir*)

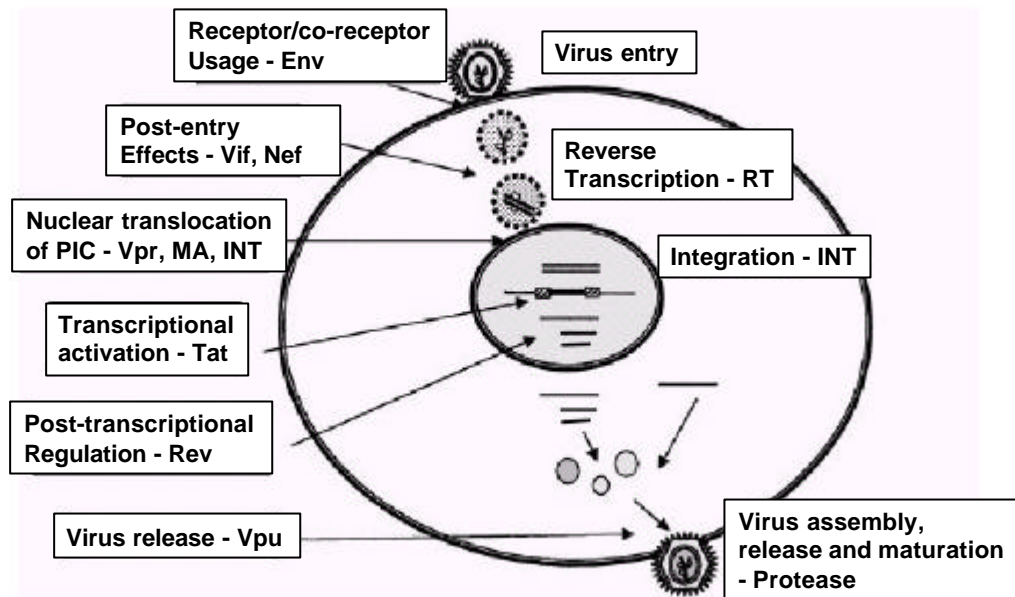
NRTIs führen, nachdem sie zellulär phosphoryliert wurden, zum Kettenabbruch der entstehenden DNA, wenn sie als Substrat der viralen Reversen Transkriptase dienen. NNRTIs hemmen die Reverse Transkriptase allosterisch und die dritte Gruppe inhibiert spezifisch die virale Protease, die essentiell für die Reifung des Virus ist (De Clercq, 2001; Darbyshire, 2000).

Derzeit üblich ist eine Dreifach-Kombination aus zwei Nukleosid-Analoga und einem Protease-Inhibitor. Allein die Medikamentenkosten hierfür betragen mind. 15.000 € pro Jahr und Patient. Ein weiteres Problem ist, dass HIV unausweichlich resistent gegen Mittel wird, die seine Replikation nicht wirklich vollständig unterbinden.

Die Resistenz gegen antiretrovirale Medikamente ist bedingt durch Mutationen in den Genen, die die Reverse Transkriptase und die Protease kodieren. Dabei entstehen etwa täglich 3000 Viren mit einer spezifischen Punktmutation. Die Gesamtheit der auf diese Weise in einem Individuum entstehenden Virusstämme wird auch als „*Quasispezies*“ bezeichnet

Da kein bisher zugelassenes Medikament jedoch eine solch 100%-ige Suppression erreicht, verliert es - allein eingenommen - nach einiger Zeit seine Wirkung. Mehr noch: dagegen unempfindlich gewordene HIV-Stämme sind oft auch resistent gegen andere Substanzen der gleichen Klasse, die dann als Alternativen ausfallen. Dieses problematische Phänomen bezeichnet man als „*Kreuzresistenz*“. Deshalb versucht man neue Substanzen zu entwickeln, die auf andere Schritte im Replikationszyklus von HIV zielen. Die ideale Vorbeugung gegen AIDS wäre aber ein Impfstoff, der den Erreger erst gar nicht im Organismus Fuß fassen ließe. (Für einen detaillierten Überblick sei auf die Reviews von Condra *et al.*, 2002 und DeClercq, 2001 verwiesen.)

Die HAART-Therapie verlangt überdies von den Patienten sehr viel Entschlossenheit und Disziplin. Ein großes Problem sind die komplexen Einnahmeschemata mit mindestens acht, häufig 16 oder mehr Anti-HIV-Tabletten täglich. Daneben muß mit Nebenwirkungen gerechnet werden, wie Hautausschlägen, Erbrechen, Durchfall, Kopfschmerzen, Anämien, Neuropathien, Leberentzündung oder Diabetes. Statistische Berechnungen der letzten Jahre haben außerdem ergeben, daß man mit HAART bis zu 60 Jahre lang therapieren muß, um HIV vollständig aus dem Körper zu eliminieren (Saag M. S. & Kilby J. M., 1999).



**Abbildung A.-9. Replikationszyklus von HIV-1 mit den Schritten, die mögliche Angriffspunkte gegen den viralen Vermehrungszyklus darstellen** (verändert nach Tang, Kuhen und Wong-Staal, 1999).

### **Pharmazeutische Ansätze gegen das Rev/RRE-System**

Es gibt verschiedene Eigenschaften von Rev, die es zum idealen Ziel für therapeutische Ansätze macht. Zum einen ist es relativ klein, und die Aminosäuresequenz seiner funktionellen Domänen ist zwischen den einzelnen HIV-Isolaten hochkonserviert. Desweiteren muß die Therapie nicht gegen alle Rev-Moleküle agieren, da die Funktion von Rev einer Kinetik unterliegt: Die Rev-Konzentration muß einen kritischen Level überschreiten, um zu einem Effekt zu führen. Zum anderen würde eine therapeutische Intervention sehr früh in die Genexpression eingreifen und so auch die Expression des cytotoxischen Env-Proteins unterbinden. Nachteile von Rev sind allerdings, dass es den selben Transportweg benutzt wie zelluläre Proteine, und dass die Rev Funktion im Zellkern lokalisiert ist, weshalb anspruchsvolle pharmazeutische Trägersysteme entwickelt werden müßten. Mittlerweile wurden schon verschiedene anti-Rev Strategien entwickelt und getestet. Aufgrund der Natur der Effektor-Moleküle kann man sie in drei Gruppen einteilen:

- auf Proteinen basierende Effektormoleküle  
(z.B. RevM10, RevSLT26, RevSLT40, Rev38, anti-Rev sFv)
- auf Nukleinsäuren basierende Effektormoleküle  
(z.B. Antisense- / Sense-RNA)
- auf Nicht-Protein/Nukleinsäuren basierende kleine Moleküle  
(z.B. Leptomycin B,  $\alpha$ -Hydroxypyridones, Aminoglycoside Antibiotics)

Erstere beinhalten verschiedene *trans*-dominante Rev-Mutanten, intrazellulär exprimierte Antikörper und kurze Peptide, die mit der Bindung von Rev an verschiedene Liganden interferieren. Zu der zweiten Gruppe gehören die „*Antisense*“-RNA und Ribozyme, die gegen das Rev-Gen (mRNA) oder gegen RRE gerichtet sind und „*Sense*“-RNA, die sozusagen als Köder fungieren. Die dritte Gruppe besteht schließlich aus kleinen Molekülen, die einen inhibitorischen Effekt auf die Rev-Funktion ausführen (Überblick: Kjems & Askjaer, 2000).

## ***Impfstoffentwicklung durch Entkopplung des Rev/RRE-Systems***

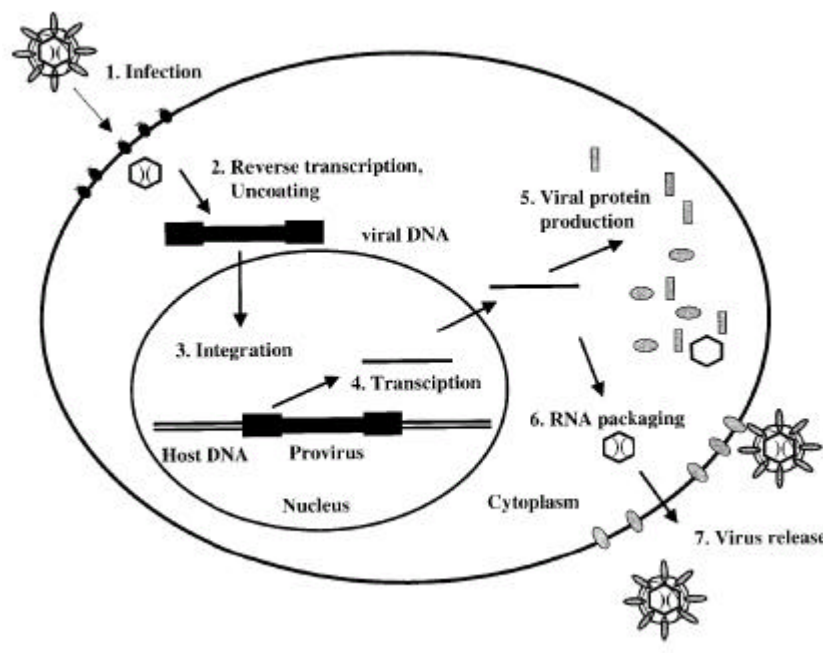
Die direkte Immunisierung mit DNA besitzt aufgrund der effizienten Stimulation des Immunsystems viele Vorteile gegenüber konventionellen - auf Proteinen basierenden - Impfstoff-Ansätzen. DNA-Impfstoffe werden zusammen mit Promotorelementen zur Kontrolle ihrer Expression in ein Vektorsystem integriert und als gereinigte DNA infiziert. Da die DNA über einen längeren Zeitraum in nativer Form im Impfling transkribiert und translatiert wird, können die daraus resultierenden Proteine eine effiziente humorale und zellvermittelte Immunantwort auslösen. Die Entwicklung von Expressionsvektoren, die auf HIV-1 Strukturgenen basieren (Die *gag/pol*-Regionen sind stärker konserviert als die *env*-Bereiche von HIV. Deshalb strebt man die Entwicklung einer HIV-Vakzine basierend auf Strukturgenen an, um damit einen Schutz gegen eine HIV-Infektion zu erzielen.) und als DNA-Vakzine genutzt werden könnten, wurde bislang aber durch die komplexe virale Regulation eingeschränkt. Zum einen limitieren sowohl *cis*-aktive Sequenzen (LTR, TAR, INS, RRE) als auch die Abhängigkeit der Expression von *trans*-aktiven Proteinen (Tat und Rev) die Effizienz der Vektoren, zum anderen stellen sie ein erhebliches Sicherheitsproblem aufgrund des pathogenen Potentials von HIV dar. Frühere Arbeiten unserer und anderer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass durch die Übertragung des Kodongebrauchs von Säugetieren auf das HI-virale *gag*-Gen, die virale Regulation - anhand *cis*-aktiver Elemente und Rev - entkoppelt werden kann. Damit war es möglich, eine DNA-Vakzine zu entwickeln, die eine Rev-unabhängige Expression der HIV-Strukturproteine erlaubte (Graf *et al.*, 2000). Dieser auf synthetisch hergestellten HIV-Genen basierende DNA-Impfstoff hat sich in Nagern als hochimmunogen erwiesen (Deml *et al.*, 2001).

## ***Etablierung von Gentherapievektoren durch Entkopplung des Rev/RRE-Systems***

Das Ziel einer Gentherapie ist es, das genetische Material einer lebenden Zelle zu verändern, dass ein therapeutischer Nutzen erreicht wird. Deshalb beinhaltet sie beispielsweise die Insertion eines funktionellen Gens in das Chromosom einer Zelle, um dort ein fehlendes oder defektes Gen zu ersetzen, oder um ein infektiöses Agens oder einen Tumor zu bekämpfen. Für eine erfolgreiche Gentherapie muß das therapeutische Gen ohne Nebenwirkungen für den Patienten exprimiert werden. Außerdem muß der Genvektor in hohen Titern zu produzieren sein, damit sichergestellt ist, dass genügend Ausgangsmaterial vorhanden ist. Im einfachsten Fall werden Gentransfer-Vektoren durch die gleichzeitige Transfektion eines Verpackungskonstruktes (Strukturproteine und Polymerasen; *gag/pol*), eines Gentransferkonstruktes (Fremdgen) sowie eines Expressionsplasmids für ein Hüll(rezeptor)-protein (*env*) hergestellt. Eine selektive Verpackung der Fremd-RNA wird durch die Deletion der Verpackungssequenz ( $\psi$ ) im Verpackungskonstrukt und das Einbringen



dieses Elements in den Gentransfervektor sichergestellt (siehe Abbildung A.-10). Lentiviren haben sich als ideale Kandidaten für die Gentherapie erwiesen, da sie zum einen die Fähigkeit haben, sowohl ruhende, post-mitotische und enddifferenzierte als auch sich teilende Zellen zu infizieren, zum anderen aber keine Immunantwort auslösen, wenn sie einmal integriert sind (Pandya *et al.*, 2001). So konnte z.B. mittlerweile ein stabiler Gentransfer in Dendritischen Zellen (Chinnasamy, N. *et al.*, 2000), in T-Zellen (Chinnasamy, D. *et al.*, 2000), in Makrophagen (Zufferey *et al.*, 1997) als auch in CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Zellen (Akkina *et al.*, 1996) durch lentivirale Vektoren erreicht werden. Anhand der Studien, die zur Entwicklung einer „Rev/RRE-entkoppelten“ DNA Vakzine führten (siehe obiger Abschnitt „Impfstoffentwicklung“) wurde gleichzeitig aber auch das Sicherheitsprofil zur Entwicklung neuer Vektoren für die Gentherapie entscheidend verbessert: Die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen mit viralen Wildtyp-Sequenzen oder der Selbstverpackung von Vektor-RNA ist aufgrund einer völlig anderen Nukleinsäuresequenz minimiert und somit auch das Risiko einer Rekonstitution neuer replikationsfähiger Viren. Zudem wird auch eine Reaktivierung endogener Retroviren oder persistierender Lentiviren durch die nun nicht mehr Rev-abhängige Genexpression vermieden. Frühere Strategien versuchten das Sicherheitsprofil lentiviraler Vektoren dadurch zu verbessern, dass Regulationselemente und -Proteine deletiert und durch funktionsgleiche, aber HIV-fremde Sequenzen ersetzt wurden. Das *env*-Gen, welches ja das RR-Element beinhaltet, kann z.B. durch das VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) G-Protein ersetzt werden. Es zeichnet sich durch seine hohe Stabilität und breiten Wirtstropismus aus. Die Abhängigkeit einer starken Transkription von der Anwesenheit von Tat (LTR-Regulation) kann durch das Einbringen eines starken Promoters (z.B. von CMV (*Cytomegalovirus*)) entkoppelt werden (Kim *et al.*, 1998). Zuletzt kann man den Rev-abhängigen Export durch ein anderes Transportsystem, z.B. CTE (*constitutive transport element* (*Mason-Pfizer Monkey Virus*)) ersetzen (Pasquinelli *et al.*, 1997).



**Abbildung A.-10. Retrovirale Verpackungszelllinie und Vektorproduktion.** Die viralen Gene der Strukturproteine und Enzyme werden von einem nicht-retroviralen Promoter aus exprimiert und sind stabil in der sog. Verpackungszelle integriert. Nach Transfektion mit einem retroviralen Vektor, der für ein bestimmtes „Fremdgen“ kodiert, wird die Vektor-RNA mit Hilfe der

*Strukturproteine verpackt und als Bestandteil des Viruspartikels aus der Zelle freigesetzt werden. Diese Viruspartikel werden aus dem Überstand geerntet und für Infektion / Transduktion von Zellen verwendet. Dort wird die Fremd-DNA aufgrund der retroviralen enzymatischen Aktivitäten schließlich in das Zellchromosom eingebaut und exprimiert das „fremde“ Gen (verändert nach: Schweizer et al., 2001).*

### **Rev-abhängige Reporter und Screening-Systeme**

Das Rev/RRE-System kann aber auch als *Screening*-System eingesetzt werden. So hat unsere Arbeitsgruppe in den vergangenen Jahren auf der Basis eines GFP-Konstruktes ein Reportersystem evaluiert.

Der im GFP enthaltene Chromophor wird durch Licht der Wellenlänge 395 nm und 475 nm angeregt und emittiert grünes Licht bei 395 nm (Kain et al., 1995). Seit nach der Klonierung des Gens nachgewiesen werden konnte, dass die Biolumineszens speziesunabhängig erhalten bleibt (Prasher et al., 1992), und das Protein *in vivo* eine hohe Stabilität aufweist, ist es häufig als Reporter in der Molekularbiologie eingesetzt worden.

Dazu wurde der Kodongebrauch von HIV auf ein GFP(*green fluorescent protein*)-Konstrukt übertragen, der HIV 5'-Hauptspleißdonor dem Leserahmen vorangestellt, sowie das virale RR-Element am 3'-Ende angefügt. Damit waren alle Bedingungen einer Rev-abhängigen Expression angepaßt (Sylvia Kehlenbeck, Diplomarbeit-RIMMH, 2000). In Transfektionsstudien mit anschließender FACS Austestung konnte hierbei bestätigt werden, dass der Einsatz von Rev-Inhibitoren (Leptomycin B und RevM10) zu einer dosisabhängigen Hemmung der Rev-vermittelten Expression von *hivGFP* führt. Daraufhin sollen jetzt Indikatorzelllinien etabliert werden, die durch stabile Integration von *hivGFP* und *rev* die Wirksamkeit eines Hemmstoffes des Rev/RRE-Systems durch eine Reduktion der konstitutiven Fluoreszenz anzeigen würden. Da durch den retroviralen Gentransfer gewährleistet ist, dass das Zielgen mittels Integrase in das Zielgenom integriert wird, und sich mit dieser Methode auf lange Sicht auch Suspensionszellen mit *hivGFP* transduzieren lassen, sollte es möglich sein, konstitutiv fluoreszierende Zelllinien herzustellen, die sich zur Identifizierung von neuen anti-Rev wirksamen Substanzen und damit HIV-Therapeutika einsetzen lassen würden (Kerstin Jungert, Diplomarbeit-RIMMH, 2001). Die Arbeiten an diesem System dauern noch an.

## **A.4. Zielsetzung der Arbeit**

In den letzten Jahren belegten initiale Untersuchungen, dass die nukleäre Akkumulation später HIV-1 Transkripte die notwendige Voraussetzung für eine zeitlich regulierte Rev/RRE-abhängige Expression der späten HIV-1 Gene ist. Diese wird durch das kombinierte Zusammenspiel unterschiedlicher *cis*-aktiver Elemente (ineffiziente Spleißstellen und inhibitorische Sequenzmotive) begründet. Fehlt nur einer dieser Aktionspartner, kommt es entweder zur nukleären Degradierung oder zum konstitutiven Kernexport der späten Transkripte.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der HI-viralen Kodonwahl - auch unter dem Einfluß ebenfalls HIV-basierender *cis*- und *trans*-aktiver Elemente (UTR, RRE, Rev) - auf die Expression verschiedener Reporterplasmide (*gag*, *gfp*, Provirus) betrachtet. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden dafür chimäre *gag*-Konstrukte hergestellt, deren Kodongebrauch auf den von hochexpmierenden Säugetier- gleichwie HI-viraler Gene basierten. Der zweite Abschnitt zielte zum einem auf die Fragestellung, welchen Einfluß interne „kryptische“ Spleißdonorstellen auf die Expression von GFP-Plasmiden haben, deren Sequenz auf die HIV-typische Kodonauswahl zurückging. Zum anderen sollte hinterfragt werden, welche Bedeutung der Kodonwahl hierbei zukommt. Dafür wurden GFP-Modellkonstrukte entwickelt, die - im Gegensatz zum HI-viralen GFP-Konstrukt - keine funktionellen oder „kryptischen“ Spleißdonorstellen mehr beinhalteten, oder sich im A/U-Gehalt voneinander unterschieden. Zuletzt sollte dann - erstmalig im proviralen Umfeld - die Bedeutung der HI-viralen Kodonwahl für die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen der HIV-1 Replikation betrachtet werden. Dafür wurden Proviren konzeptiert, die innerhalb des *gag*-Leserahmens in analoger Weise zu den zuvor hergestellten chimären *gag*-Konstrukten Sequenzveränderungen aufzeigten.

## B. Material

### B.1. Reagenzien

Alle Chemikalien wurden - wenn nicht anders angegeben - von SIGMA (Deisehofen), FLUKA CHEMIE (Buchs, Schweiz) oder MERCK (Darmstadt) bezogen. Die Bezugsquelle der Medien, Marker (DNA, RNA, Protein), Enzyme, Antikörper und verwendeten Kits werden hier eigens aufgeführt. Ansonsten sind die Herstellerfirmen der Reagenzien an entsprechender Stelle im Methodenteil genannt.

### B.2. Bakterienstämme und Nährmedien

#### B.2.1. Bakterienstämme

- DH5a:** F- ( $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 ( $r_k^- m_k^+$ ) supI  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169  
(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)
- GM169:** mutS453 dam-3 thr-1 ara-14 leuB6 del(gpt-proA) 62 lacY1 tsx-33 supE44 galK2 hisG4 metB1 rfbD1 mgl-51 rpsL260 kdgK51 mtl-1 thi-1 deoB16  
(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)
- GM2163:** F- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsc-78 supE44 McrA- McrB-  
(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen)

#### B.2.2. Nährmedien für Bakterien

##### B.2.2.1. Flüssigmedien

- LB-Medium** 5 g NaCl, 10 g Bacto-Tryptan, 5 g Hefeextrakt ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,3
- TB-Medium** 12 g Bacto-Tryptan, 24 g Hefeextrakt, 4 ml Glycerol ad 900 ml H<sub>2</sub>O, nach Autoklavieren Zugabe von 100 ml steriler Lösung A (2,31 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12,54 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad 100 ml H<sub>2</sub>O)
- 50 x SOC-Medium** 19,8 g Glucose, 26,6 g MgSO<sub>4</sub>, 20,4 g MgCl<sub>2</sub> ad 100 ml H<sub>2</sub>O; sterilfiltriert
- SOB-Medium** 20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 ml 1 M KCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,0; autoklaviert

##### B.2.2.2. Nährböden

- LB<sub>0</sub>-Agar** LB-Medium mit 1,5% Agar
- LB<sub>Amp</sub>-Agar** LB-Medium mit 1,5% Agar und 50 - 200 µg/ml Ampicillin

### B.3. Eukaryontische Zelllinien und Nährmedien

#### B.3.1. Adhärent wachsende Säugerzelllinien:

- H1299** p53-negative, humane Lungenkarzinomzellen (Mitsudomi *et al.*, 1992)  
(Dulbecco's Mod Eagle Medium, 10% FKS, 1% Pen/Strep)  
(aus den Zellbeständen der Arbeitsgruppe Dobner, RIMMH)

<b>C<sub>2</sub>C<sub>12</sub></b>	murine Muskelmyoblasten (Trask <i>et al.</i> , 1988) (Dulbecco's Mod Eagle Medium, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep) (Lochmüller, Genzentrum München)
<b>COS-7</b>	mit SV40-TAg ( <i>Simian virus 40 large T-antigen</i> ) immortalisierte Affennierenepithelzellen (ATCC: CRL-1651) (Dulbecco's Mod Eagle Medium, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep)
<b>293 T</b>	humane Ad5/SV40 transformierte Nierenepithelzellen (aus den Zellbeständen der Arbeitsgruppe Dobner, RIMMH) (Dulbecco's Mod Eagle Medium, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep)
<b>NIH-3T3</b>	murine embryonale Fibroblastenzellen (Dulbecco's Mod Eagle Medium, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep)
<b>„MAGIs“</b>	humane CD4+/LTR-β-Gal HeLa, HPV-18 transformierte Cervixkarzinomzellen (Kimpton und Emermann, 1992) (Dulbecco's Mod Eagle Medium, 10% FKS, 1% Pen/Strep; zur Selektion: 0,2 mg/ml G418, 0,1 mg/ml Hygromycin B)

Die Zellen stammen, falls nicht anders angegeben, aus den Beständen der Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH.

### ***B.3.2. In Suspension wachsende Säugerzelllinien:***

<b>MT4</b>	humane T-Zell Lymphoblasten (mit integriertem HTLV-1) (RPMI 1640, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep)
<b>CEM</b>	humane Lymphoblasten (RPMI 1640, 20% FKS, 2 mM Glutamin, 1% Pen/Strep)

Die Zellen stammen aus den Beständen der Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH.

### ***B.3.3. Basalmedien und Zusatzkomponenten für Säugerzelllinien:***

GIBCO/BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen: *Dulbecco's Mod Eagle Medium*, FKS

PAN-SYSTEM, Aidenbach: RPMI 1640 Medium, Pen/Strep (100 µg/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin), Glutamin, Geneticin (G 418), Hygromycin B

## **B.4. Nukleinsäuren**

### ***B.4.1. Plasmidvektoren***

pcDNA3.1(+)-Expressionsplasmid	INVITROGEN, Leek NV (NL)
pCR-Script <sup>TM</sup> SK(+)-Plasmid (Amp <sup>r</sup> )	STRATAGENE, Heidelberg
plin8p55Δ4 (pUC8-Ursprungsvektor)	Ralf Wagner, RIMMH

**pcDNA3.1(+)-Expressionsplasmid:** Der Polylinker des vom pUC19-Vektor abgeleiteten eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1(+) (5.446 bp) wird von den T7- und Sp6-Promotoren flankiert. Die Transkription integrierter Gensequenzen erfolgt unter Kontrolle des human Cytomegalovirus (hCMV)-immediate-early Promotors. Die Transkripte werden mit Hilfe des Vektor-eigenen Polyadenylierungssignals BGHpolyA (*bovine growth hormone polyA*) polyadenyliert. Innerhalb des Polylinkers befindet sich zudem das ATG-Codon als Translationsstartpunkt, so daß Gensequenzen exprimiert werden können, die selbst kein

Startcodon besitzen. Der Vektor enthält zusätzlich Resistenzgene: *amp* für die Selektion in transfizierten, prokaryontischen, sowie *neo* für die Selektion in transfizierten, eukaryontischen Zellen.

**pCR-Script™ SK(+)-Plasmid (Amp<sup>r</sup>):** Dieser Klonierungsvektor (2.961 Basenpaare (bp)) wurde aus dem pBluescript®SK(+)-Phagemid durch die Einführung einer *SrfI*-Schnittstelle in den Polylinker (MCS: multiple cloning site) generiert (GenBank® *database*: *Accession* # U46017).

Der Polylinker befindet sich innerhalb des *lacZ'*-Gens ( $\alpha$ -Peptid) und wird von den T3- und T7-Promotoren flankiert. Das partielle *lacZ'*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *lac*-Promotors erlaubt eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Plasmide mittels  $\alpha$ -Komplementation. Das Ampicillin-Resistenz-Gen ermöglicht die Selektion positiver Transformanten.

**plin8p55D4 (pUC8-Ursprungsvektor):** Ausgangspunkt für die Herstellung des plin8p55 $\Delta$ 4-Vektors war eine speziell zusammengestellte synthetische Polylinkersequenz (Restriktionsenzymchnittstellen, um die direkte Expression in *E. coli*, die Insertion zusätzlicher DNA Sequenzen sowie nachfolgende Subklonierung in eukaryontische Transfervektoren zu ermöglichen) gegen die der originale Polylinker von pUC8 ausgetauscht wurde. Der gesamte p55-kodierende Bereich von HIV-1 (BH10, siehe B.4.2. Plasmide) wurde schließlich über *Bam* HI / *Sal* I reinkloniert (Doktorarbeit, Ralf Wagner, 1992).

## B.4.2. Plasmide

pcDNA3.1(+)-syngag	hier: syngag	Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH
pcDNA3.1(+)-wtgag	hier: wtgag	Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH
pcDNA3.1(+)-UTR-syngag-RRE	hier: UTR-syngag-RRE	Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH
pcDNA3.1(+)-UTR-wtgag-RRE	hier: UTR-wtgag-RRE	Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH
pCsRevsg25-GFP	hier: pcRev	Joachim Hauber, Erlangen
pCsRevsg25M10BLGFP	hier: pcRevM10	Roland Stauber, Erlangen
pcRev	hier: pcwtRev	N. Neumann, GSF, München
huGFP, hivGFP		Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH
pHX10	hier: HX10	Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH

Alle in dieser Arbeit verwendeten HIV-spezifischen Gen- und Aminosäuresequenzen entstammen dem Klon BH10 des französischen HIV-1 Subtyp B Isolates IAI/IIIB (accession number: M15654). Als Matrize der Klonierungen diente hierbei das Provirusplasmid pHX10, welches die provirale Sequenz von BH10 mit den flankierenden LTR-Regionen des Isolates HXB2 enthält (Ratner *et al.*, 1987).

## B.4.3. Oligonukleotide

Die genaue Sequenz (5'-3'-Orientierung) und Bezeichnung der benötigten Oligonukleotide (100  $\mu$ M, entsalzt, lyophilisiert, DMT Monitoring) (METABION, Martinsried) ist in den nachstehenden Tabellen aufgeführt. Dabei wurden folgende Abkürzungen verwendet: A oder for bezeichnet den *forward*-Primer; B oder rev den *revers*-Primer.

### B.4.3.1. PCR-Primer

	Primer für die Herstellung der chimären <i>gag</i> -Expressionskonstrukte
ch1A	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Eco</i> RI (unterstrichen) 5'-GTACCGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTA-3'
ch1B	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Sty</i> I (unterstrichen) 5'-GGCCTCCTTGGTGTCTTTTATCTCTATCCTTTG-3'

ch2A	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Sty</i> I (unterstrichen) 5'-GGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA-3'
ch2B	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Stu</i> I (unterstrichen) 5'-GCTGAAGGCCTTCTCTTCTACTACTTTTACCCATGC-3'
ch3A	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Stu</i> I (unterstrichen) 5'-GGAGAAGGCCTTCAGCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTC-3'
ch3B	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Eco</i> RV (unterstrichen) 5'-TGCTGATATCCAGAATGCTGGTAGGGCTATACATT-3'
ch4A	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Eco</i> RV (unterstrichen) 5'-GCATCCTGGATATCAGACAAGGACCAAAAGAACC-3'
ch4B	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Bst</i> EII (unterstrichen) 5'-GTGTTGGTTACCTGGCTCATTGCTTCAGCCAAA-3'
ch5A	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Bst</i> EII (unterstrichen) 5'-AGCCAGTAACCAATACAGCTACCATAATGATG-3'
ch5B	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Bgl</i> II (unterstrichen) 5'-GGGCCAGATCTTCCCTAAAAAATTAGCCTGTCT-3'
ch6A	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Bgl</i> II (unterstrichen) 5'-GGGCAAGATCTGGCCTTCTACAAGGGAAGG-3'
ch6B	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Bam</i> HI (unterstrichen) 5'-GCCGAGCTCCTCGAGGCTCCCGGATCCTTATTGTGACGAGGGGTGC-3'
ch3aB	Antisense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Sac</i> II (unterstrichen) 5'-CGCTGCCGCGTTCTCTCATCTGGCCTGGT-3'
ch3bA	Sense-Primer für die <i>wtgag</i> Amplifikation ab <i>Sac</i> II (unterstrichen) 5'-GAGCCCCGCGGAAGTGACATAGCAGGAAGTACT-3'

	<b>Primer für die Herstellung der chimären Provirus-Konstrukte</b>
Cla-for	Sense-Primer für die <i>syngag</i> Amplifikation ab <i>Cla</i> I (unterstrichen) 5'-GATCGATGGGAGAAGATCAGGCTGAGGCC-3'
Nsp-forward	Sense-Primer für die Erzeugung der <i>Nsp</i> V Schnittstelle (Mutationen unterstrichen) 5'-GGATCAGAAGAAGCTTCGAAGCTTATATAATACAGTAGC-3'
Nsp-revers	Anti-Sense Primer für die Erzeugung der <i>Nsp</i> V Schnittstelle (Mutationen unterstrichen) 5'-GCTACTGTATTATATAAGCTTCGAAGTTCTTCTGATCC-3'
Nsp-for	Sense-Primer für die <i>syngag</i> Amplifikation ab <i>Nsp</i> V (unterstrichen) 5'-CTTCGAAGCCTGTACAACACCGTGGCCACCC-3'
Spe-for	Sense-Primer für die <i>syngag</i> Amplifikation ab <i>Spe</i> I (unterstrichen) 5'-ACTAGTACCCTGCAGGAGCAGATCGGCTGG-3'
Spe-rev	Anti-Sense Primer für die <i>syngag</i> Amplifikation ab <i>Spe</i> I (unterstrichen) 5'-GGGTACTAGTGGTGCCGGCGATGTCGCTGCC-3'
Apa-rev	Anti-Sense Primer für die <i>syngag</i> Amplifikation ab <i>Apa</i> I (unterstrichen) 5'-GGGGCCCGGCAGTTCCTGGCGGTGTGGCC-3'

	<b>Primer für die Subklonierung von proviralem <i>gag</i> aus genomischer DNA bzw. für die RT-PCR aus UTR-<i>chgag</i>-RRE</b>
UTR-for	Sense-Primer für die <i>gag</i> Amplifikation ab dem UTR-Bereich (9 bp BH10 / 1 bp UTR) 5'-CGACGCAGGACTCGGCTTGC-3'
BH10-Bcl-rev	Anti-Sense Primer für die <i>gag</i> Amplifikation ab dem Bereich um <i>Bcl</i> I (1876 bp BH10) 5'-GCAACCAATCTGAGTCAACAG-3'
RRE-rev	Anti-Sense Primer für die <i>gag</i> Amplifikation aus dem RRE Bereich heraus (82 bp RRE) 5'-GGGTGCTACTCCTAATGG-3'

### B.4.3.2. Sequenzierprimer

Die 5'-Primer (f = *forward*) und 3'-Primer (r = *revers*) T7 bzw. Sp6 und M13 wurden durch das instituts-eigene Synthesegerät hergestellt.

T7-f	5'-GAATTGTAATACGACTCACTATAG-3'
Sp6-r	5'-GATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'
M13-r	5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'
S1	Sense-Primer zur Kontrolle von <i>ch-/syngag</i> ab Position 372 bp 5'-GCAGCCAGGTGAGCCAGAAC-3'
S2	Sense-Primer zur Kontrolle von <i>ch-/syngag</i> ab Position 786 bp 5'-CAAGAGGTGGATCATCCTGGGC-3'
S3	Sense-Primer zur Kontrolle von <i>ch-/syngag</i> ab Position 1174 bp 5'-GCTTCAACTGCGCAAGGAG-3'
BH10-S0	Sense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 2 bp (BH10) 5'-GCTCTCTCGACGAGGACTCGGC-3'
BH10-S1	Sense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 781 bp (BH10) 5'-GCACCAGGCCAGATGAGAGAACC-3'
BH10-S2	Sense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 1118 bp (BH10) 5'-GCATTGGGACCAGCGGCTACA-3'
BH10-S3	Sense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 1432 bp (BH10) 5'-CTACAAGGGAAGGCCAGGG-3'
BH10-S3-rev	Anti-Sense Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 1432 bp (BH10) 5'-CCCTGGCCTTCCCTTGTAGG-3'
BH10-S4-rev	Anti-Sense Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 1575 bp (BH10) 5'-GGATACAGTTCCTTGTCTATCGGCTCC-3'
BH10-2476-rev	Antisense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 2476 bp (BH10) 5'-CCTACATACAAATCATCC-3'
BH10-3810-rev	Antisense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 3810 bp (BH10) 5'-CCAGGATAACTTTTCC-3'
BH10-4794-rev	Antisense-Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 4794 bp (BH10) 5'-CCTAGGGCTAACTATGTGTCC-3'
BH10-6014-rev	Anti-Sense Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 6014 bp (BH10) 5'-CCCGCTACTACTATTGG-3'
BH10-7884-rev	Anti-Sense Primer zur Kontrolle des (chimären) Provirus ab Position 7884 bp (BH10) 5'-GGTAGCTGAAGAGGCACAGG-3'

Desweiteren wurden für die Sequenzierung der (chimären) Proviren institutseigene Primer verwendet, von denen nur noch die Position, nicht aber die genaue Sequenz bekannt ist, weswegen sie hier nicht aufgeführt sind.

## B.5. DNA- / RNA-Molekulargewichtsstandards

MGS-VII, MGS-VIII

0,2 - 10 kb RNA-Marker

BOEHRINGER, Mannheim

SIGMA, Deisenhofen

## B.6. Protein-Molekulargewichtsstandards

SDS-7, SDS-6H

Precision Plus Protein™

SIGMA, Deisenhofen

BIO-RAD, München



## B.7. Enzyme

BOEHRINGER, Mannheim:

*Apa* I, *Bam* HI, *Bcl* I, *Bgl* II, *Bst* EII, *Cla* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Hind* III, *Kpn* I, *Nsp* V, *Pvu* I, *Sac* I, *Spe* I, *Stu* I, *Sty* I, *Xho* I mit den benötigten Puffern  
T4-Polynucleotid-Kinase mit entsprechenden 10 x Puffer

NEW ENGLAND BIOLABS GmbH, Schwalbach/Taunus:

*Sac* II mit den benötigten Puffer  
T4-DNA-Ligase mit entsprechenden 10 x Puffer

## B.8. Antikörper

### *primäre Antikörper:*

Anti-p24 monoklonaler Antikörper (16/4/2),  
von der Maus (aa. 307 - 336) (Wolf *et al.* 1990)  
Anti-p24 monoklonaler Antikörper (13/5),  
von der Maus (aa. 147 - 154) (Wolf *et al.* 1990)  
Anti-RT monoklonaler Antikörper,  
vom Schaf  
Anti-Env monoklonaler Antikörper (gp120),  
von der Maus (aa. 308 – 322) (NEA-9305)  
Anti-GFP polyklonaler Antikörper,  
vom Kaninchen

Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH

Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH

MRC\*

\*AIDS Programme Reagent Project, England

DU PONT, Dreieich

CLONTECH, Heidelberg

### *sekundäre Antikörper:*

Anti-Mausimmunoglobulin (ges. Ig),  
HRP-konjugiert, vom Kaninchen  
Anti-Mausimmunoglobulin,  
AP-konjugiert, vom Kaninchen  
Anti-Kaninchenimmunoglobulin,  
HRP-konjugiert, von der Maus  
Anti-Kaninchenimmunoglobulin,  
AP-konjugiert, von der Maus  
Anti-Schafimmunoglobulin,  
HRP-konjugiert, vom Kaninchen

DAKO, Hamburg

BIO-RAD, München

PIERCE, Bonn

DAKO, Hamburg

DAKO, Hamburg

### *für p24 Capture Assay-ELISA benötigte Antikörper:*

mAK 11-G-7 (aa. 113 - 128),  
mAK 10-E-7 (aa. 193 - 223) (Niedrig *et al.*, 1988, 1989)  
AK MO1, biotinylierter AK 37G12  
Streptavidin-POD-Konjugat

M. Niedrig, RKI, Berlin

POLYMUN SCIENTIFIC, Wien

ROCHE, Mannheim

## B.9. Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitor-Cocktailtabletten

BOEHRINGER, Mannheim

## B.10. Kommerziell erhältliche Kits

Nucleobond-AX (*Plasmid Extraction Kit*)

*TMB Substrate Reagent Set*

*Riboprobe<sup>a</sup> System-T7*

*RNeasy Kit*

*QIAquick Gel Extraction Kit*

*QIAquick PCR Purification Kit*

*QIAamp DNA Kit*

*FuGENE 6 Transfection Reagent*

*TaqPlus Precision<sup>TM</sup> PCR System*

MACHEREY-NAGEL, Düren

PHARMINGEN, Heidelberg

PROMEGA, Mannheim

QIAGEN, Hilden

ROCHE, Mannheim

STRATAGENE, Heidelberg

## B. 11. Computerprogramme und Datenbanken

Die Texte und Tabellen dieser Arbeit wurde mit dem Textverarbeitungsprogramm *Word for Windows*, Version 7.0 (MICROSOFT) auf einem IBM-kompatiblen *Personal Computer* (PC) erstellt. Die Zeichnungen und Diagramme wurden mit den Programmen *Excel* Version 7.0 (*Software Publishing*), *SigmaPlot<sup>®</sup>* Version 4.0 (JANDEL) und *Microsoft Powerpoint* Version 6.0 angefertigt. Die Western-Blots und Filme wurden in einem Flachbrettscanner (ACER) eingescannt, im *Adobe Photoshop* (D3.0) bearbeitet und in *Microsoft Powerpoint* Version 6.0 beschriftet. Die Northern-Blots wurden mit einem „Molecular Imager<sup>R</sup> System GS-363“ (BIO-RAD, München) ausgewertet und wie die Western-Blots bearbeitet.

Die DNA-Sequenzierungen wurden mit dem Programm *SequEd<sup>®</sup>*, Version 1.0.3 (*Applied Biosystems*) auf einem Apple Computer (MACINTOSH) ausgewertet.

Die Computeranalysen wurden mit dem Sequenzanalyse-Paket HUSAR/GCG (*Steinbeis-Transferzentrum Genominformatik, Heidelberg*) durchgeführt.

Die Literatursuche wurde mit der MEDLINE-Datenbank (*National Library of Medicine*) und mittels PubMed gemacht.

## C. Methoden

### C. 1. Allgemeine Zellkulturtechniken (Prokaryonten)

#### C.1.1. Anzucht und Kultivierung von Bakterien in Flüssig- und Plattenkultur

Kulturen von *Escherichia coli* (E. coli) können auf Agarplatten oder in Flüssigkultur vermehrt werden. Zum Anlegen von Plattenkulturen wurden mit einer sterilen Impfähse von einer Bakterienflüssigkultur Bakterien aufgenommen, auf einer Agarplatte ausgestrichen und nach einer inversen Inkubation über Nacht (ÜN) bei 37°C im Brutschrank Einzelkolonien isoliert. Die Kulturplatten sind mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert bis zu 4 Wochen haltbar. ÜN-Flüssigkulturen wurden durch Animpfen von 5 bis 2500 ml sterilem LB- bzw. TB-Medium (je nach Verwendungszweck) mit einer gepickten Einzelkolonie von einer Plattenkultur (bei großen Volumina mit einer ÜN-Flüssig-Vorkultur) angelegt. Diese wurden im Schüttelinkubator (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC, Edison/NJ, USA) bei 37°C und 200 Umdrehungen pro Minute („rounds per min.“, rpm) ÜN angezogen. Zur Selektion wurde dem Medium Ampicillin zugesetzt. Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen das Kulturmedium als Referenz.

#### C.1.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode wurden aus einer Glycerinkultur 20 ml LB-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 5 ml dieser ÜN-Kultur in einem Gemisch von 100 ml LB- und 500 ml SOC-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 (1 OD<sub>600</sub> = 8 x 10<sup>8</sup> Bakterien/ml) inkubiert. Zum Ernten wurde die Kultur auf zehn 50 ml-Falcon-Röhrchen verteilt und 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C in einer Hettich-Standzentrifuge (KONTRON INSTRUMENTS, Neufahrn) abzentrifugiert. Im folgenden wurde stets zügig und auf Eis gearbeitet. Die Bakterienpellets wurden in 16 ml eiskaltem Transformationspuffer 1 (12 g RbCl, 9,9 g MnCl<sub>2</sub> • 4 H<sub>2</sub>O, 30 ml 1 M KAc pH 7,5, 1,5 g CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 150 g Glycerin ad 1 l H<sub>2</sub>O; pH 5,8; sterilfiltriert) resuspendiert, auf vier 50 ml-Falcon-Röhrchen verteilt, und danach 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde jedes Pellet in 4 ml eiskaltem Transformationspuffer 2 (20 ml 0,5 M MOPS pH 6,8, 1,2 g RbCl, 11 g CaCl<sub>2</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 150 g Glycerin ad 1 l H<sub>2</sub>O; pH 6,8; sterilfiltriert) aufgenommen. Die nunmehr kompetenten Bakterien wurden in 200 µl Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße (EPPENDORF, Hamburg) abgefüllt, durch Eintauchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

### C.2. Allgemeine, standardisierte Klonierungstechniken

#### C.2.1. Isolierung von DNA

##### C.2.1.1. Präparation, Reinigung und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Charakterisierung der hergestellten Subklone wurde die Plasmid-DNA nach dem Protokoll der alkalischen Schnell-Lyse aufgereinigt („Minipräp.“ nach Birnboim und Doly, 1979).

Für Subklonierungen wurde dagegen die benötigte Plasmid-DNA über *Nucleobond*-Säulen (Anionenaustauscherchromatographie) nach Angaben des Herstellers (MACHEREY & NAGEL, Düren) gereinigt. Je nach der benötigten DNA-Konzentration sind Midi (*Nucleobond-Tip 100*)- oder Maxi (*Nucleobond-Tip 500*)-Säulen verwendet worden.

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrophotometers (VARIAN GmbH, Darmstadt) in einem UV-Adsorptionsspektrum zwischen 230 und 320 nm festgestellt. Aus dem Wert der O.D. bei einer Wellenlänge von 258 nm ( $O.D._{258}$ ) konnte die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet werden ( $1 O.D._{258} = 47,5 \mu\text{g dsDNA/ml}$ ).

## **C.2.1.2. Präparation von genomischer DNA aus Säugetierzellen**

Die Isolierung genomischer DNA aus Säugetierzellen wurde mit dem *QIAamp DNA Kit* (QIAGEN, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **C.2.2. Reinigung von PCR-Fragmenten**

Die Reinigung von doppelsträngigen PCR-Produkten von Oligonukleotid-Primern, Polymerasen, Nukleotiden und Salzen wurde nach Angaben des Herstellers mittels eines *QIAquick PCR Purification Kits* unter Zuhilfenahme von *QIAquick Spin-Säulchen* durchgeführt. Die Analyse des Reinheitsgrades und die Abschätzung der Konzentration von PCR-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (C.2.6.).

## **C.2.3. Enzymatische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Charakterisierung der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNA, sowie für präparative Zwecke wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen enzymatisch geschnitten. Eine Einheit [U] bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1  $\mu\text{g}$   $\lambda$ -DNA in einer Stunde bei geeigneter Temperatur und optimalen Puffer-, bzw. pH-Bedingungen vollständig zu spalten.

Zur Charakterisierung gereinigter Plasmid-DNA wurde 1  $\mu\text{g}$  DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease und 1/10 Volumen Restriktionspuffer in einem 20  $\mu\text{l}$  Ansatz gespalten.

Für präparative Zwecke sind in einem Standardansatz 5  $\mu\text{g}$  bis 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit je 50 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  ebenfalls mit 1/10 Volumen Restriktionspuffer für mindestens zwei Stunden inkubiert worden.

## **C.2.4. Phosphorylierung von blund-end DNA-Fragmenten**

Um die Ligation eines amplifizierten *blund-end* DNA-Fragmentes, welches in dieser Arbeit durch das *TaqPlus Precision™* PCR-System (C.3.1.) erzeugt wurde, zu ermöglichen, müssen die 5'-Enden phosphoryliert werden. Dazu wurde die T4-Polynucleotid-Kinase (Richardson 1981; Midgley and Murray, 1985) (ROCHE, Mannheim) verwendet, die die Übertragung des terminalen  $\gamma$ -Phosphat von ATP auf das 5'-Hydroxylende von DNA oder RNA katalysiert.

Der Reaktionsansatz (20 U T4-Polynucleotid-Kinase, 3  $\mu\text{l}$  10-fach Puffer, 3  $\mu\text{l}$  10 mM ATP, 1 bis 5  $\mu\text{g}$  DNA, ad 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ ) wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die Kinase bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert.

Danach erfolgte eine Reinigung mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN, Düren) - nach Angaben des Herstellers.

## **C.2.5. Dephosphorylierung von geschnittenen Vektoren**

Um die Selbstligation eines *blund-end* bzw. einfach-sticky geschnittenen Vektors zu verhindern, müssen die 5' Enden dephosphoryliert werden. Dazu wurde die *Calf Intestine Phosphatase* (CIP)

(ROCHE, Mannheim) verwendet, die die Hydrolyse von 5' Phosphatresten von DNA, RNA sowie von Ribo- und Deoxyribonukleosidtriphosphaten zu 5' Hydroxyenden katalysiert.

Der Reaktionsansatz (0,1 U CIP, 1 bis 20 pmol DNA, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) wurde zusammen pipettiert, eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend die Phosphatase bei 75°C für 10 Minuten inaktiviert. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit dem *QIAquick PCR Purification* Kit (QIAGEN, Düren) - nach Angaben des Herstellers.

## **C.2.6. Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente (0,1 kbp bis 10 kbp) nach ihrem Molekulargewicht erfolgt bei konstanter Stromstärke und Spannung (50 V bis 150 V). Je nach errechneter Größe der DNA-Fragmente wurde zwischen 0,8% und 2,0% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM NaAc, 2 mM EDTA) unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (SIGMA, Deisenhofen) in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt. Die DNA-Fragmente wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v) Saccharose) versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit entsprechenden Molekulargewichtsmarkern aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Durchlichtschirms (BACHHOFFER LABORATORIUMSGERÄTE, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm, dem Absorptionsmaximum des DNA-interkallierenden Ethidiumbromids.

## **C.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die über Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden für die anschließende Ligation aus dem Agarose-Gel geschnitten. Für die weitere Extraktion von DNA-Molekülen mit einer Größe von 200 bp bis 10 kbp eignete sich die *QIAquick Gel Extraction*-Methode (QIAGEN, Düren), bei der die DNA selektiv unter Hochsalzbedingungen an die Silikat-Säulenmatrix gebunden und anschließend bei Niedrigsalzbedingungen mit einer 10 mM Tris/HCl pH 8,5 - Lösung nach Angaben des Herstellers von der Säule eluiert wurde.

## **C.2.8. Ligation von Vektor- und Insert-DNA**

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in einem molaren Vektor : Insert-Verhältnis von 1 : 3 bis 1 : 10 in die Ligation eingesetzt. Der Standardligationsansatz von 20 µl enthielt neben 100 ng Vektor-DNA, 20 U T4-DNA-Ligase, 1 x T4-Ligase-Puffer, sowie unterschiedliche Konzentrationen an Fremdgen-DNA. Die Reaktion erfolgte entweder eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht (ÜN) bei 14°C im Wasserbad und konnte anschließend direkt zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt werden.

## **C.2.9. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Die kompetenten *E. coli*-Zellen (100 - 200 µl) werden auf Eis aufgetaut, mit 4 µl einer 0,5 M β-Mercaptoethanol-Lösung versetzt, 5 Minuten inkubiert und danach mit ca. 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbiert, werden die Proben für 45 Sekunden auf 42°C (Hitzeschock) erwärmt und anschließend mindestens fünf Minuten auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wird dann nach Zugabe von unselektivem LB-Medium so lange unter Schütteln inkubiert, bis die Antibiotikaresistenz des transformierenden Plasmids exprimiert wird. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die

Bakteriensuspension auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C im Brutschrank angezogen. Die Analyse rekombinanter Transformanten erfolgte durch Restriktionsverdau.

### C.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur exponentiellen (bis zur  $10^7$ -fachen) *in vitro* Vervielfältigung definierter Nukleotidsequenzen (Saiki *et al.*, 1988). Die Durchführung der PCR-Reaktionen erfolgte in einem programmierbaren PERKIN ELMER GENEamp™ 9600-Thermocycler. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Reaktionen mit gestopften Spitzen (BIOZYM, Hess. Oldendorf) angesetzt.

#### C.3.1. TaqPlus Precisionä PCR System (STRATAGENE)

Diese Methode wurde zur Generierung der *blund-end* linearisierten chimären *gag*- und Proviren-Subkonstrukte angewendet.

Die Taq-DNA-Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, ist eine hitzestabile DNA-abhängige 5'-3'-DNA-Polymerase mit hoher Prozessivität (ca. 1 min/kb), besitzt aber keine Exonukleaseaktivitäten.

Die aus *Pyrococcus furiosus* isolierte, thermostabile DNA-abhängige Pfu-DNA-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität (*proofreading*) und erlaubt daher eine äußerst fehlerfreie Amplifikation von *blund-end* DNA-Fragmenten. Die Prozessivität ist allerdings mit zwei min/kb geringer als die der Taq-Polymerase und erlaubt nur eine Amplifikation von 5 - 10 kb großen DNA-Fragmenten.

Durch die Verwendung eines Gemischs aus Pfu-DNA-Polymerase und Taq-DNA-Polymerase (Taq2000™) lassen sich im *TaqPlus Precision*™ PCR System die Vorteile beider DNA-Polymerasen miteinander kombinieren, so daß auch große DNA-Fragmente über 15 kbp mit einer hohen Effizienz und minimaler Fehlerrate in kurzer Zeit amplifiziert werden können.

Der Reaktionsansatz (1 µl 5 U *TaqPlus* Polymerase, 10 µl 10-fach Puffer, 8 µl 10 mM dNTP, 2 µl 5 µM *forward*-Primer, 2 µl 5 µM *revers*-Primer, 10 - 250 ng DNA, ad 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) wurde unter folgenden PCR-Bedingungen inkubiert.

Schritt		Temperatur	Dauer
1	Initiation	94°C	1 Min.
<b>3-Stufen-PCR: 35 Zyklen</b>			
2	Denaturierung	94°C	1 Min.
	Annealing	55°C	1 Min.
	Elongation	72°C	1 Min./kbp
3	End-Elongation	72°C	10 Min.
4		4°C	∞

### **C.3.2. Zielgerichtete in vitro Mutagenese mittels PCR (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE))**

Diese Methode eignet sich zum Einfügen oder Entfernen von Punktmutationen in definierte Bereiche doppelsträngiger Plasmid-DNA. Mit Hilfe zweier komplementärer, 30 bp bis 45 bp langer Oligonukleotidprimer mit GC-reichen Enden, die in ihrer Sequenz den gewünschten Austausch enthalten, wird in einer PCR-Reaktion *dam*-methylierte Plasmid-DNA als Matrize verwendet und durch die *Pfu*-DNA-Polymerase (3'-5'-Exonuklease-Aktivität) amplifiziert. Die Entfernung der methylierten Ausgangs-DNA wird durch die Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym *Dpn* I gewährleistet. *Dpn* I erkennt spezifisch die Sequenz 5'-G<sup>m6</sup>ATC-3' und spaltet sie endonukleolytisch. Die mutierte, zirkuläre, nicht-methylierte und noch unligierte dsDNA wird nach der Transformation von *E. coli* durch die bakterielle DNA-Ligase kovalent geschlossen.

Die PCR-vermittelte, ortsgerichtete Mutagenese wurde ausgehend von 25 ng bis 50 ng Ziel-DNA in einem 50 µl Ansatz nach Herstellerangaben unter den angegebenen Standard-Bedingungen durchgeführt und führte zur Einführung der Mutationen im *plin8p55Δ4* Vektor, wodurch die *Nsp* V-Schnittstelle kreiert wurde.

Schritt		Temperatur	Dauer
1	Initiation	94°C	3 Min.
<b>3-Stufen-PCR: 16 Zyklen</b>			
2	Denaturierung	94°C	1 Min.
	Annealing	55°C	45 Sek.
	Elongation	68°C	2 Min./kbp
3	End-Elongation	68°C	10 Min.
4		4°C	∞

### **C.3.3. DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzanalyse der jeweiligen Plasmid-DNA erfolgte durch automatisierte, nicht-radioaktive Fluoreszenzsequenzierung, die auf der Basis der Dideoxynukleotid-vermittelten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) beruht.

Je Ansatz wurden in einem Endvolumen von 12 µl 500 ng DNA mit 6 pmol des entsprechenden Oligonukleotids versetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte unter Zuhilfenahme des PRISM<sup>®</sup> Ready Reaction DyeDeoxy<sup>a</sup> Terminator Cycle Sequencing Kits (PERKIN ELMER BIOSYSTEMS, Weiterstadt). Die DNA-Fragmente wurden über ein denaturierendes 7%-iges Harnstoff-Polyacrylamidgel in einem 377A-DNA-Sequenzier-apparat (PERKIN ELMER BIOSYSTEMS, Weiterstadt) aufgetrennt und mit Hilfe des SeqEd<sup>®</sup>-Programms (Version1.03, PERKIN ELMER BIOSYSTEMS, Weiterstadt) auf einem APPLE-MACINTOSH-Computer ausgewertet.

Ab 2002 erfolgte die Sequenzierung über die Firma GENEART (Regensburg).

## C.4. Allgemeine Zellkulturtechniken (Eukaryonten)

### C.4.1. Kultivierung von Säugerzellen

Die adhärent wachsenden H1299-, C2C12- und COS-7, 293 T, NIH-3T3 und „MAGI“-Zellen wurden in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Wenn eine konfluente Zellschicht vorlag, wurden die Zellen nach Waschen mit PBS mit 0,25%iger Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCO, Eggenstein) von der Unterlage der Zellkulturflasche (BD Falcon<sup>TM</sup>, BD BIOSCIENCES, Frankreich) abgelöst und im Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gesplittet.

Die in Suspension wachsenden MT4- und CEM-Zellen wurden ebenfalls in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Wenn eine konfluente Zelllösung vorlag, wurden die Zellen im Verhältnis von 1:1 bis 1:10 gesplittet.

### C.4.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 100 µl einer resuspendierten Zellkultur mit einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (MERCK, Darmstadt) in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:20 vermischt. Durch das Eindringen des blauen Farbstoffes durch die Zellmembran von toten Zellen können diese leicht von lebenden, transparenten Zellen unterschieden werden.

## C.5. Transfektion von Zellen

### C.5.1. Transfektionsmethoden

#### C.5.1.1. Transfektion von adhären Zellen durch CaHPO<sub>4</sub>-Präzipitation

Adhären Zellen lassen sich effizient mit der CaHPO<sub>4</sub>-Präzipitations-Methode (Graham and Eb, 1973) transfizieren, bei der ein CaHPO<sub>4</sub>-DNA-Präzipitat über Endozytose von der Zelle aufgenommen wird.

Hierzu wurden am Vortag der Transfektion die Zellen in einer 6-Napf-Platte (FALCON, Heidelberg) in 3 ml DMEM-Medium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Dabei wurde folgende Zellzahl jeweils ausgesät:

H1299:	2,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen
C2C12:	1 x 10 <sup>5</sup> Zellen
COS-7:	4 x 10 <sup>5</sup> Zellen
NIH-3T3:	2,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen

Mindestens eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Für die Transfektion wurde 15 µg Endotoxin-freie Plasmid-DNA mit 30 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> (sterilfiltriert) in einem Volumen von 300 µl vereint und unter Vortexen tropfenweise zu 300 µl des 2 x HeBS (HEPES bufferes saline)-Puffers (8,2 g NaCl, 5,95 g HEPES, 0,105 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> und pH 7,05!) pipettiert. Während des 20-minütigen Inkubationschrittes bei RT bildete sich das Präzipitat aus, das anschließend tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben wurde. Danach wurden die Zellen zunächst für 14 Stunden und nach erneutem Wechsel des Mediums für insgesamt 48 Stunden im Brutschrank kultiviert.

Für die Transfektion von H1299 mit Proviren wurden diese in Petrischalen ausgesät (1 x 10<sup>6</sup> Zellen, 12 ml). Der Transfektionsansatz betrug hierbei die dreifache Menge an DNA und Reagenzien des normalen. Die Zellen wurden hier i.d.R. nach 60 - 72 Stunden geerntet. Für die Transfektion von 293 T-Zellen mit Proviren für die spätere RNA Gewinnung wurden diese in



Petrischalen ausgesät ( $2 \times 10^6$  Zellen, 12 ml) und mit dem analogen Transfektionsansatz wie die H1299-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden dann nach zwei, vier, sechs, neun, zwölf und 15 Stunden für die RNA-Isolierung (C.8.1.) geerntet.

## **C.5.1.2. Transfektion von Suspensionszellen mit FuGENE 6**

Das Transfektionsreagenz FuGENE 6 (ROCHE, Mannheim) ist eine nicht-liposomale Lösung, die ein breites Spektrum eukaryontischer Zellen mit hoher Effizienz und minimaler Zytotoxizität transfiziert.

Zur Transfektion wurden  $7,5 \times 10^6$  MT4- oder CEM-Zellen in einem 15-ml Falcon (GREINER, Frickenhausen) abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml serumfreien RPMI-Medium resuspendiert. Die zu transformierende *Nucleobond*-DNA (1 µg) wurde nach Angaben des Herstellers mit FuGENE 6 behandelt und auf die Zellsuspension langsam aufgetropft. Nach einer Inkubation von drei Stunden im Brutschrank wurde serumhaltiges Medium zu den Zellen gegeben und diese in eine normale Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, stehend) zur weiteren Kultivierung überführt.

## **C.5.2. Ernte und Aufarbeitung der Zellen und Zellkulturüberstände nach Transfektion zur Analyse der Expression viraler Proteine**

Zur Analyse der Expression viraler Proteine in eukaryontischen Zellen mußten die adhären Zellen bzw. Zellkulturüberstände geerntet und aufgearbeitet werden.

Dazu wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS (*phosphate buffered saline* (Sambrook *et al.*, 1989)) gewaschen und in 1 ml eiskaltem PBS mit Hilfe eines Zellschabers quantitativ von der Oberfläche des Napfes gelöst. Die Zellen wurden bei  $1.000 \times g$  (Erdbeschleunigung) in Eppendorff-Reaktionsgefäßen pelletiert. Zur Aufarbeitung der Zellen wurde das Zellpellet in 100 µl RIPA-Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl 0,1% SDS, 1% Nonidet P40, 0,5% Natrium-Deoxycholat mit Protease-Inhibitor-Cocktailtablette (BOEHRINGER, Mannheim)) resuspendiert, unter zweimaligen Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen bei 37°C im Wasserbad (*freeze-and-thaw-cycles*) aufgeschlossen und zur Entfernung der Zelltrümmer bei  $14.000 \times g$  abzentrifugiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

## **C.6. Analyse von Proteinen**

### **C.6.1. Quantitative Proteinbestimmung (BIORAD)**

Für die Analyse der Proteine aus den transfizierten und lysierten Zellen (siehe CaHPO<sub>4</sub>-Transfektion (C.5.1.1.)) (dabei Proteine aus dem Mediumüberstand vorher mit Triton X-100-Lösung lysieren; vgl. *p24 Capture Assay* (C.6.5.)), wurde zunächst deren Gesamtproteinmenge pro Ansatz quantitativ mit dem *Bradford-Protein-Assay* nach Angaben des Herstellers (BIORAD, München) bestimmt.

Das Reagenz dieses Testsystems unterliegt nach Bindung an Proteine einer Farbänderung, die sich photometrisch in einer Absorptionszunahme bei 595 nm äußert. Aus dem Vergleich der gemessenen O.D. mit den Werten einer BSA-Eichkurve läßt sich die Proteinmenge näherungsweise abschätzen.

*Durchführung:*

Unterschiedliche Verdünnungen (1 : 200 bis 1 : 400) der zu bestimmenden Proteinprobe wurden in Polystyrol-Küvetten (SARSTEDT, Nümbrecht) mit PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 14,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> •

12 H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0 bis 7,7) jeweils auf ein Gesamtvolumen von 800 µl gebracht und nach Zugabe von 200 µl Färbereagenz zwischen 10 und 60 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde photometrisch die Absorption bei 595 nm gegen den Nullwert (800 µl PBS + 200 µl Färbereagenz) bestimmt.

Mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden (1µg/ml bis 20 mg/ml), die parallel dazu angesetzt und vermessen wurde, konnte die jeweilige Gesamtproteinmenge der einzelnen Proben mit einer Genauigkeit von ca. 85% bestimmt werden.

## **C.6.2. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ-geladene SDS in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladungen so, daß alle Proteine annähernd ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern können. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (Fling and Gregerson, 1986) zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert, von welchem alle Polypeptide gemeinsam in das eigentliche Trenngel übergehen.

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele sind der Beschreibung der Gerätehersteller (BIOMETRA, Göttingen) zu entnehmen, die genaue Zusammensetzung der Gellösungen ist in nachfolgender Tabelle zusammengefaßt. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellen SDS-PAGE-Laufpuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 190 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 20 bis 100 mA, je nach verwendeter Gelgröße und Apparatur. Die Auftrennung wurde gestoppt, nachdem die Bromphenolblau-Bande gerade ausgelaufen war.

Für die SDS-PAGE wurden pro Ansatz 100 µg Protein mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (5 x Boiling Mix: 0,4 g Tris, 0,5 g SDS, 2,5 ml β-Mercaptoethanol, 1 ml 25 mM EDTA, 3 ml Glycerin, eine Spatelspitze Bromphenolblau, pH 6,8, ad 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) versetzt. Nach Denaturierung der Proteine für drei Minuten bei 95°C wurden sie direkt auf das SDS-Gel aufgetragen.

	12,5% Trenngel-Lösung	5% Sammelgel-Lösung
Protogel™ (30% Acrylamid, 0,8% Bis-)	6 ml	0,99 ml
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	3,6 ml	
0,625 M Tris/HCl pH 6,8		1,2 ml
0,5 % SDS	3,6 ml	1,2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	4,8 ml	2,6 ml
TEMED (Tetramethyldiamin)	15 µl	6 µl
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	90 µl	30 µl

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine über eine Anfärbung des Gels mit Coomassie Brillant Blau (C.6.3.) nachgewiesen.

## **C.6.3. Protein-Färbung mit Coomassie Brillant Blau**

Für die Anfärbung von aufgetrennten Proteinen mit Coomassie Brillant Blau (SIGMA, Deisenofen) wurden die Proteingele nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (C.6.2.) mindestens für

fünf Stunden bei RT in einer Färbelösung (45% Methanol, 10% Eisessig, 0,25% Coomassie Brilliant Blau R250) inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele in einer Entfärbelösung (45% Methanol, 10% Eisessig) solange leicht geschüttelt, bis der Hintergrund klar und nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Zur Konservierung wurden die Gele anschließend auf Whatman®-3MM-Papier im Vakuum bei 65°C für zwei Stunden getrocknet.

## **C.6.4. Detektion spezifischer Proteine mit Hilfe monoklonaler Antikörper im Western-Blot**

### **C.6.4.1. Proteintransfer auf Nitrocellulose: Western-Blot-Analyse**

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf Nitrocellulose (Millipore Immobilon NC pure, MILLIPORE, Bedford) erfolgte in einer Fast-Blot „semidry“-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) mit dem BIORAD-Transferpuffer (150 mM Glycin, 25 mM Tris p 8,3, 10% Methanol) nach Angabe des Herstellers für 20 bis 60 Minuten bei einer Stromstärke von 5 mA/cm<sup>2</sup>. Die denaturierten Proteine wandern, entsprechend ihres Molekulargewichts, in Richtung Anode und werden auf der Nitrocellulose immobilisiert. Zur Überprüfung des erfolgten Proteintransfers und zur Markierung der Molekulargewichtsstandards wurden die Proteine reversibel mit Ponceaurot S-Lösung (Sambrood *et al.* 1989) angefärbt und anschließend durch Waschen mit TTBS-Puffer (*tween-tris buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/ HCl pH 7,5, 0,02 M Tween 20) wieder entfärbt.

### **C.6.4.2. Detektion über eine Enzym/Substrat-vermittelte Farbreaktion**

Der Nachweis von Proteinen beruht auf der spezifischen Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Die chemische Reaktion durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) bzw. Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*, HRP) führt schließlich zu einer Anfärbung des Proteins. Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulose nach dem Proteintransfer erfolgte für mindestens eine Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C mit einer 5%igen Magermilch-TBS (*tris bufferes saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5)-Lösung. Danach wurde die Nitrocellulosefolie dreimal 15 Minuten mit TBS und abschließend einmal 10 Minuten mit TTBS gewaschen, bevor sie ÜN bei 4°C mit einer ausgetesteten Verdünnung des primären Antikörpers (Env, 16/4/2: 1:2000, GFP: 1:1000, RT: 1:500) inkubiert, wiederum mit TBS und TTBS gewaschen und anschließend mindestens eine Stunde lang mit einer 1 : 2000 - Verdünnung des AP- bzw. HRP- gekoppelten Antikörpers geschüttelt wurde. Nach erneutem Waschen folgte die Färbung mit den chromogenen Substraten der alkalischen Phosphatase (68 µl NBT, 70 µl BCIP in 20 ml AP-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris (Sambrook *et al.*, 1989)) bzw. Meerrettich-Peroxidase (5 ml 0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 2,4 ml 10% NiCl<sub>2</sub>, 30 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, eine Spatelspitze 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), ad 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>). Die Färbereaktionen wurden durch Waschen der Nitrocellulosefolie mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> abgestoppt.

### **C.6.4.3. Detektion rekombinanter Proteine durch eine Enzym/Substrat vermittelte Lichtreaktion (ECL<sup>+</sup>, Amersham Biosciences)**

Für den Nachweis rekombinanter Proteine mittels Autoradiographie-Film (KODAK, Opex) wurde der Western Blot, wie unter Abschnitt C.6.4.2. beschrieben, mit einem HRP-gekoppelten Antikörper behandelt. Die Färbung erfolgte dann allerdings mit den ECL-Lösungen A und B in einem Verhältnis 1:1, die in einem lichtgeschützten Gefäß auf die Nitrocellulose-Membran

gegeben und im Dunkeln bei RT eine Minute inkubiert wurden. Anschließend wurde die Membran auf einem Whatman®-3MM-Papier zügig von der Reagenzmischung befreit und in eine Filmkassette gelegt. Eine Klarsichtfolie wurde daraufhin luftblasenfrei über die Membran plaziert, um später die Autoradiographie-Filme vor zuviel Restfeuchtigkeit zu schützen. In der Dunkelkammer wurden dann zu unterschiedlichen Expositionszeiten (1 bis 5 Minuten, bzw. ÜN) die Filme aufgelegt und anschließend entwickelt.

## **C.6.5. Nachweis von Pr55<sup>gag</sup>-Lipopolyprotein bzw. p24 durch einen HIV-1 ELISA**

### **C.6.5.1. Nachweis des Pr55<sup>gag</sup>-Lipopolyproteins aus transfizierten und lysierten Zellen durch einen HIV-1 p24 Capture Assay-ELISA nach Niedrig**

Die Austestung der chimären gag Expressionsplasmide erfolgte durch einen HIV-1 p24-ELISA nach M. Niedrig (Berlin) (Niedrig *et al.*, 1988, Niedrig *et al.*, 1989).

Hierzu wurde mAK 11-G-7 mit 0,1 M Carbonatpuffer pH 9,5 (Mischung aus 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> und 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) auf eine Endkonzentration von 25 µg/ml eingestellt. Mit je 100 µl dieser Verdünnung wurden die Löcher einer 96-Well-Polystyrol-Maxisorb-Platte (NUNC; Roskilde, Dänemark) gefüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zum Austesten wurden 450 µl vom abgenommenen Mediumüberstand mit 50 µl einer 5% Triton X-100 Lösung versetzt, gevortext und mindestens 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde eine 1 : 5 - oder 1 : 10 - Verdünnung mit Verdünnungspuffer (Waschpuffer mit 0,5% BSA) hergestellt.

Für den Nachweis im Zellysatz ist das Aufschließen der Partikel durch den RIPA-Lysepuffer schon erfolgt. Deshalb wurde nur noch eine entsprechende Verdünnung (je nach Bandenstärke im Western Blot: 1 : 10 oder 1 : 50) hergestellt.

Desweiteren war noch eine Pr55<sup>gag</sup>-Standardreihe anzufertigen, um qualitativ den ELISA auswerten zu können. Hierfür wurden 12 µl einer auf 50 ng/µl eingestellten Pr55<sup>gag</sup>-Protein-Lösung (Arbeitsgruppe Wagner, RIMMH) mit 12 µl einer 1% Triton X-100 versetzt, gevortext und mindestens 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 276 µl Verdünnungspuffer hinzu gegeben und eine Standardreihe pipettiert, die Konzentrationen von 200 ng bis zu 1,5625 ng beinhaltet.

Nach diesen Vorarbeiten wurde die beschichtete Platte sechsmal mit je 200 µl Waschpuffer (0,22 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> • H<sub>2</sub>O, 1,65 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2H<sub>2</sub>O, 17,54 g NaCl, 1 ml Tween 20, ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) gewaschen, nach jedem dritten Waschen gut ausgeklopft und schließlich mit je 100µl Proben- oder Standard-Verdünnungen befüllt. Danach wurden je 100 µl des auf 2,5 µg/ml eingestellten POD markierten mAK 10-E-7 hinzu pipettiert, die Platte mit Folie überklebt und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach nochmaligem Waschen und Ausklopfen erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe des Enzymsubstrats o-Phenylendiamin nach Angaben des Herstellers (ABBOTT LABORATORIES, Wiesbaden). Die Reaktion wurde nach 5 bis 30 Minuten durch die Zugabe von je 100 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beendet. Die Absorption der - bei positivem Ergebnis - gelb/orange-farbigem Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) in einem ELISA Reader der Firma SLT LABINSTRUMENTS Deutschland GmbH bestimmt. Mit Hilfe der Pr55<sup>gag</sup>-Eichgeraden wurden anschließend die Mengen Pr55<sup>gag</sup> pro µg Gesamtproteinmenge bestimmt.

### ***C.6.5.2. Nachweis von p24 aus transfizierten bzw. infizierten und lysierten Zellen durch einen HIV-1 p24 Capture Assay-ELISA nach Stoiber***

Die Analyse der chimären Proviren erfolgte durch einen HIV-1 p24-ELISA, der von H. Stoiber (Innsbruck) etabliert wurde. Dieser hat sich bei der Austestung im Vergleich zu der Methode nach Niedrig als empfindlicher erwiesen. Die dafür notwendigen Antikörper M01 und 37G12 wurden über POLYMUN SCIENTIFIC (Wien, Österreich) bezogen.

Der Virusüberstand wurde durch Zugabe von 5% Triton X-100 (Endkonzentration: 0,5%) und anschließender 15-minütiger Inkubation inaktiviert. Für den Nachweis im Zelllysate ist das Aufschließen der Partikel durch den RIPA-Lysepuffer schon erfolgt. Deshalb wurde nur noch eine entsprechende Verdünnung hergestellt.

Zur Quantifizierung der p24-Konzentration in Zelllysaten und Zellkulturüberständen aus infizierten Zellen wurden 96-Well Maxi-Sorb-Mikrotiterplatten (NUNC, Wiesbaden) mit je 100 µl einer 1:300 Verdünnung des p24-spezifischen Antikörpers M01 in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,5) (siehe C.6.5.1.) ÜN bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Zelllysate sowie der p24-Standard seriell (50 - 0 ng/ml) in Verdünnungspuffer (PBS / 1% BSA) verdünnt. Je 100 µl der Proben wurden nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer (PBS / 0,05% Tween-20) aufpipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurden je 50 µl einer 1:5000 Verdünnung des zweiten, biotinylierten p24-spezifischen Antikörpers 37G12 in Verdünnungspuffer auf die Platte gegeben und diese eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Nach zehnmaligem Waschen wurden 100 µl einer 1:10000 Verdünnung des Straptavidin-POD-Konjugats (ROCHE, Mannheim) zugefügt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT folgten die letzten zehn abschließenden Waschschrte. Die Antikörper-Antigen Komplexe wurden unter Verwendung von je 100 µl TMB-Substratlösung, welche nach erfolgter Farbreaktion mit 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt wurde, bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) in einem ELISA Reader der Firma SLT LABINSTRUMENTS Deutschland GmbH detektiert. Mit Hilfe der p24-Eichgeraden wurden anschließend die Mengen an p24 pro µg Gesamtproteinmenge bestimmt.

## **C.7. Anreicherung von Viruspartikeln über Saccharosekissen**

Viruspartikel konnten aus dem Überstand transfizierter H1299 Zellen durch Pelletieren über ein 20%iges (w/v)-Saccharosekissen in PBS (ohne bivalente Ionen) (2,5 Stunden bei 28.000 rpm in einem TFT41.14 Rotor, KONTRON INSTRUMENTS, Neufahrn) gereinigt werden. Das so erhaltene Pellet wurde in PBS (ohne bivalente Ionen) ÜN resuspendiert.

Danach wurde von jeweils einem Aliquot der erhaltenen Suspension eine Gesamtproteinbestimmung mittels BioRad (C.6.1.), ein Protein-Reinheitstest mittels Coomassie Brilliant Blau Färbung (C.6.3.) und ein spezifischer Protein-Nachweis mittels Western Blot-Analyse (C.6.4.) durchgeführt.

## **C.8. Isolierung und Analyse von RNA**

### ***C.8.1. Gewinnung von RNA aus adhärenenten Zellen nach Transfektion***

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen wurden beim Arbeiten mit RNA ausschließlich sterile, gestopfte Pipettenspitzen als auch Plastikpipetten verwendet. Alle Apparaturen und Gefäße wurden zuvor mit 0,2 M NaOH gereinigt. Die Lösungen wurden mit DEPC-behandelten H<sub>2</sub>O (0,1% DEPC; autoklaviert) hergestellt und durch Filtration oder Autoklavierung sterilisiert. Desweiteren wurden alle Arbeitsschritte wenn möglich unter gekühlten Bedingungen zügig durchgeführt.

Zur Isolierung von RNA mußten transfizierte Zellen geerntet und aufgearbeitet werden. Die adhärennten Zellen wurden mit Trypsin-EDTA (LIFE-TECHNOLOGIE, Karlsruhe) abgelöst und nach Zugabe von FKS abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch Zugabe von RLN-Lysepuffer (140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) in eine nukleo- und zytoplasmatische Fraktion geteilt, die jeweilige Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy-Mini Kites (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers gewonnen und in RNasen-freiem Wasser bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrophotometers (VARIAN GmbH, Darmstadt) in einem UV-Adsorptionsspektrum zwischen 230 und 320 nm festgestellt. Aus dem Wert der O.D. bei einer Wellenlänge von 258 nm (O.D.<sub>258</sub>) konnte die Konzentration einzelsträngiger RNA (ssRNA) nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet werden (1 O.D.<sub>258</sub> = 40 µg ssRNA/ml).

## **C.8.1.1. Detektion spezifischer RNA mit Hilfe von RNA-Sonden im Northern Blot**

### **C.8.1.1.1. In vitro-Transkription zur Herstellung radioaktiver RNA-Sonden**

Radioaktive „antisense“ RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription unter Verwendung des Riboprobe® Systems-T7 (PROMEGA, Madison, USA) nach Protokoll hergestellt. Als radioaktiv markiertes Nukleotid wurde [<sup>32</sup>P]-α-CTP (50 µCi pro Reaktion) (AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) verwendet. Als Transkriptionsmatrize wurden jeweils 500 ng linearisierte und über Qiagen-Säulchen gereinigte Plasmid-DNA eingesetzt. Die RRE-spezifische RNA-Sonde wurde durch T7 vermittelte Transkription von *Xho* I-linearisiertem pcR-ERR erzeugt. Die Neomycin spezifische RNA Sonde wurde ebenfalls durch T7 vermittelte Transkription von *Eco* RI-linearisiertem pcR-Neo´ hergestellt. Neomycin wurde deshalb als interne Kontrolle verwendet, da ausschließlich erfolgreich transfizierte Zellen über das Neomycin-Gen auf dem pcDNA3.1(+)-Expressionsplasmid das Antibiotikum und somit auch dessen RNA produzieren. Dies läßt einen Rückschluß auf die Transfektionseffizienz der unterschiedlichen Konstrukte zu und kann somit zugleich als interner Vergleich dienen. Die β-Aktin spezifische RNA Sonde wurde durch Sp6 vermittelte Transkription von *Eco* RI-linearisiertem pGEM<sub>3</sub>-Aktin hergestellt. β-Aktin ist ein normales Zellprotein, deshalb kann der Nachweis seiner RNA als Quantifizierung der Effizienz der RNA Isolierung dienen. Die produzierten Sonden wurden schließlich noch über Centriscin-20 Säulen (PRINCETON SEPERATIONS, Adelphia, USA) gereinigt. Dazu wurde die Matrix der Säulen für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 650 µl H<sub>2</sub>O inkubiert, überschüssige Flüssigkeit abzentrifugiert (2700 rpm, soft, 2 Minuten) und die radioaktiv markierte RNA-Sonde nach Zugabe des *in vitro* Transkriptionsansatzes durch Zentrifugation (2700 rpm, 2 Minuten) in ein 1,5 ml Auffanggefäß eluiert.

### **C.8.1.1.2. Detektion spezifischer RNA im Northern Blot**

Jeweils 5 µg Gesamt-RNA (nukleo- oder zytoplasmatische) wurden mit Probenauftragspuffer (4 mM EDTA, 4 x MOPS-Laufpuffer, 0,9 M Formaldehyd, 20% Glycerin, 30% Formamid, 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol) auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt und fünf Minuten bei 65°C aufgeköcht. Die so behandelte RNA wurde auf einem 1%igen Formaldehyd-Agarosegel (1% Agarose, 1x MOPS-Laufpuffer, 6,5% Formaldehyd) in einem 1x MOPS-Laufpuffer (0,4 M MOPS, 10 mM EDTA, 0,1 M NaAc, pH 7,0) elektrophoretisch (100 V, 2-3 h) aufgetrennt. Als Standard wurden ebenfalls 2 µl eines 0,2 - 10 kb RNA-Markers (SIGMA, Deisenhofen) aufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel dreimal 20 Minuten in DEPC-Wasser (autoklaviertes 0,1% DEPC / H<sub>2</sub>O-Gemisch), 17 Minuten in 0,05 N Natronlauge und schließlich 45

Minuten in 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 7,0) gewaschen. Das Blotten auf eine positiv geladene Nylonmembran (*Biodyne Plus*, PALL, Dreieich) erfolgte mittels Saugblottapparat in 20x SSC ÜN. Am nächsten Tag wurde die Membran fünf Minuten in 5x SSC gewaschen und auf Whatman®-3MM-Papier getrocknet. Danach wurde die RNA durch UV Bestrahlung (1200 kJ, 1 Minuten) im Stratalinker (STRATAGENE, Heidelberg) auf der Membran fixiert („*Crosslinking*“). Die zur Größenorientierung unspezifische Anfärbung der 18S- (ca. 1,9 kb) und 28S- (ca. 5 kb) RNA erfolgte durch 0,03% Methylenblau / 0,3M NaAc. Danach wurde die Membran mit DEPC-Wasser entfärbt, für eine interne Kontrolle fotografiert und für zwei Stunden bei 60°C in Prä-Hybridisierungspuffer (5x SSPE, 5x Denhardts Reagenz (100x: 1% Ficoll-400, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA), 0,1% SDS, 50% Formamid, 0,4 mg/ml tRNA (ROCHE, Mannheim)) im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Schließlich erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten RNA-Sonde (C.8.1.1.1.) ÜN. Am dritten Tag wurde der Blot nach mehrmaligem stringenter Waschen (0,1x SSC / 0,1% SDS) bei 60°C und einem finalen 10-minütigen Waschschrift mit DEPC-Wasser bei RT in eine Klarsichtfolie eingeschweißt. Durch Exposition an eine Phosphor-Imager Platte wurde der Blot mit Hilfe der *Molecular Analyst Software* (BIO-RAD, München) ausgewertet und/oder nach einer Inkubation ÜN bei -80 °C autoradiographisch (*KODAK Biomax MR*, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg) detektiert.

## C.9. Studien mittels Infektion von Zellen mit Proviren

### ***C.9.1. Indirekter Nachweis der Tat Expression nach Infektion mit Provirus-Überstand mit Hilfe der Indikatorzelllinie HeLa-LTR- $\beta$ -Gal: MAGI(multinuclear activation of galactosidase indicator)-Assay***

Die Analyse der Freisetzung infektiöser Viren nach Transfektion von H1299 mit Provirus-DNA-Konstrukten wurde mit der CD4<sup>+</sup>-Indikatorzelllinie HeLa-LTR- $\beta$ -Gal (Klimpton & Eneerman, 1992 und Wu & Kappes, 1997) durchgeführt. Die CD4<sup>+</sup>-HeLa-Zelllinie trägt eine in das Genom der Zelle integrierte Kopie des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens unter der Kontrolle des HI-viralen LTR-Promoters, der zunächst inaktiv ist. Nach erfolgreicher Infektion der Zelle durch die nach Transfektion freigesetzten Proviren wird als eines der ersten Genprodukte von HIV das Regulatorprotein Tat exprimiert. Dadurch wird der LTR-Promoter aktiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase produziert. Die  $\beta$ -Galaktosidase trägt zudem eine artifizielle Kernlokalisierungssequenz (NLS), so daß nach Zugabe einer Substratlösung die  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden und somit infizierten Zellen an einer intensiven Blaufärbung der Zellkerne zu erkennen sind.

Für den Test wurden 8 x 10<sup>4</sup> „MAGI“-Zellen pro Well in eine 12-Napf-Platte (FALCON, Heidelberg) ausgesät. Nachdem die adhärenz wachsende Zellen eine Konfluenz von 20% erreicht hatten, wurden sie mit Virusüberstand infiziert. Dieser wurde 62 Stunden nach Transfektion abgenommen und dann in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt - 1:1 - 1:10 - 1:100) in einem Endvolumen von 500 µl Medium in Gegenwart von 20 µg/ml DEAE-Dextran in STBS (25 mM Tris/HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) auf die „MAGI“-Zellen gegeben und im Brutschrank für zwei bis vier Stunden inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Platte alle 30 Minuten mit einer Achterbewegung geschwenkt. Danach wurden die Zellen mit PBS (ohne bivalente Ionen) gewaschen und mit frischem Medium weiterkultiviert. 60 bis 72 Stunden nach Infizierung wurden die Zellen einmal mit PBS (ohne bivalente Ionen) gewaschen und mit 500 µl Fixierlösung (1% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd) für 5 Minuten bei RT fixiert. Danach wurde dreimal mit PBS (ohne bivalente Ionen) gewaschen. Die Blaufärbung der Zellkerne, als Indikator der Tat-Aktivität und somit der erfolgreichen HIV-

Infizierung, wurde nach einer Inkubation von drei Stunden in einer  $\beta$ -Galaktosidase-Substratlösung (4 mM Ferricyanid, 4 mM Ferrocyano, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% Dimethylsulfoxid, 0,4 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indol- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal) in PBS) durch mehrmaliges Waschen mit PBS (ohne bivalente Ionen) beendet, und anschließend unter Verwendung eines Durchlichtmikroskops (LEIKA, DMR) aufgenommen.

## ***C.9.2. Replikationsstudien mit HI-Proviren in MT4- und CEM-Zellen***

### ***C.9.2.1. Replikationskinetik: „Kurzzeitversuch“***

Für die Analyse der Replikationskinetik wurden pro Ansatz  $7,5 \times 10^6$  CEM-Zellen nach der FuGENE 6-Transfektionsmethode (C.5.1.2.) transfiziert und anschließend über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen kultiviert. Dabei wurden die Zellen jeweils nach 48 Stunden 1:1 gesplittet, wobei hierbei gleichzeitig Zellkulturüberstand für eine spätere gemeinsame p24 *Capture Assay*-ELISA-Auswertung (C.6.5.2.) gesammelt wurde.

### ***C.9.2.2. Sequenzmutationen über die Zeit: „Langzeitversuch“***

Für die Replikationsstudie, die dazu diente, Rückmutationen bei den chimären, proviralen Konstrukten über die Zeit hin zu beobachten, wurden pro Ansatz  $7,5 \times 10^6$  MT4-Zellen nach der FuGENE 6-Transfektionsmethode (C.5.1.2.) transfiziert und über einen Zeitraum von drei Monaten kultiviert. Dabei wurde in der Regel alle 14 Tage die Lebendzellzahl durch Zugabe neuer Zellen auf  $7,5 \times 10^6$  eingestellt. Für die Analyse des p24-Kapsid Antigens mit dem p24 *Capture Assay*-ELISA (C.6.5.2.) wurde alle zwei bis drei Wochen Zellkulturüberstand abgenommen. Gleichzeitig wurde ein Aliquot an Zellen zur späteren Isolierung der genomischen DNA (C.2.1.2.) eingefroren.

## ***C.9.3. Titration des Provirus-Überstandes mit MT4 Zellen***

Zur Bestimmung des HIV-1 Virustiters aus H1299-Zellen wurde der Mediumüberstand 48 bis 60 Stunden nach Transfektion mit proviraler DNA (C.5.1.1.) abgenommen, und es wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  in einer seriellen Verdünnung auf  $5 \times 10^4$  MT4-Zellen (in 100  $\mu\text{l}$  Medium, 48-Napfplatte) gegeben. Danach wurde der Ansatz für sieben Tage im Brutschrank kultiviert, wobei jeden zweiten Tag frisches Medium (200  $\mu\text{l}$ ) zugegeben wurde. Die Virus-Replikation erfolgte durch Quantifizierung des p24-Capsid-Antigens mittels p24 *Capture Assay*-ELISA (C.6.5.2.) aus dem Zellkulturüberstand. Mit jeder Verdünnung des Virusstocks wurden jeweils zehn unabhängige Infektionen durchgeführt. Der reziproke Wert der Verdünnung, bei der in fünf von zehn Ansätzen eine Virusreplikation nachweisbar war, ergab den Virustiter des Stocks, bei dem 50% der Gewebekulturen infiziert waren.



## D. Ergebnisse

### D.1. Gesamtkonzept

In den letzten Jahren belegten initiale Untersuchungen, dass die nukleäre Akkumulation später HIV-1-Transkripte die notwendige Voraussetzung für eine zeitlich regulierte Rev/RRE-abhängige Expression der späten HIV-1 Gene ist. Diese wird durch das kombinierte Zusammenspiel unterschiedlicher *cis*-aktiver Elemente (ineffiziente Spleißstellen und inhibitorische Sequenzmotive) begründet. Fehlt nur einer dieser Aktionspartner, kommt es entweder zur nukleären Degradierung oder zum konstitutiven Kernexport der späten Transkripte.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der HI-viralen Kodonwahl - auch unter dem Einfluss ebenfalls HIV-basierender *cis*- und *trans*-aktiver Elemente (UTR, RRE, Rev) - auf die Expression verschiedener Reporterplasmide (*gag*, *gfp*, HI-Provirus) betrachtet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden dafür chimäre *gag*-Konstrukte hergestellt, deren Kodongebrauch auf den von hochexpmierenden Säugetier- gleichwie HI-viraler Gene basierten. Die nach Transfektion in unterschiedliche Säugetierzellen erhaltenen Expressionsraten sollten erste Hinweise über die Natur und Lokalisation der postulierten inhibitorischen Sequenzen liefern. Unterschiede in der Expression sollten dann auf RNA Ebene hinterfragt werden. Dazu sollten der Einfluss distinkter Sequenzabschnitte auf den Kernexport durch Quantifizierung nukleärer und zytoplasmatischer RNAs im Northern Blot erfaßt werden.

Der zweite Abschnitt der Arbeit zielte zum einen auf die Fragestellung, welchen Einfluss interne „kryptische“ Spleißdonorstellen auf die Expression von GFP-Plasmiden haben, deren Sequenz auf der HIV-typischen Kodonwahl basiert. Zum anderen sollte belegt werden, welche Bedeutung der Kodonwahl hierbei zukommt. Dafür wurden GFP-Modellkonstrukte entwickelt, die - im Gegensatz zum HI-viralen GFP-Konstrukt - keine funktionellen oder „kryptischen“ Spleißdonorstellen mehr beinhalteten, oder sich im A/U-Gehalt voneinander unterschieden. Um die Bedeutung dieser Veränderungen auszutesten, sollten die Konstrukte im Hinblick ihrer Expression unter Einfluss *cis*-ständiger und HI-viraler *trans*-aktiven Elemente hin untersucht werden.

Zuletzt sollte dann - erstmalig - im proviralen Umfeld die Bedeutung der HI-viralen Kodonwahl für die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen der HIV-1 Replikation betrachtet werden. Dafür wurden Proviren konzipiert, die innerhalb des *gag*-Leserahmens in analoger Weise zu den zuvor hergestellten chimären *gag*-Konstrukten Sequenzveränderungen aufzeigten. Akzeptiert man die grundlegende Bedeutung des HIV-typischen Kodongebrauchs für den Rev-abhängigen RNA-Export und damit für die zeitlich streng regulierte Abfolge der HIV-spezifischen Genexpression, so sollte dies abhängig vom Grad der Chimärisierung einen eindeutig attenuierten, in der Replikation beeinträchtigten Phänotyp nach sich ziehen. Hier sollten dann die molekularbiologischen Grundlagen für die Attenuation herausgearbeitet werden.

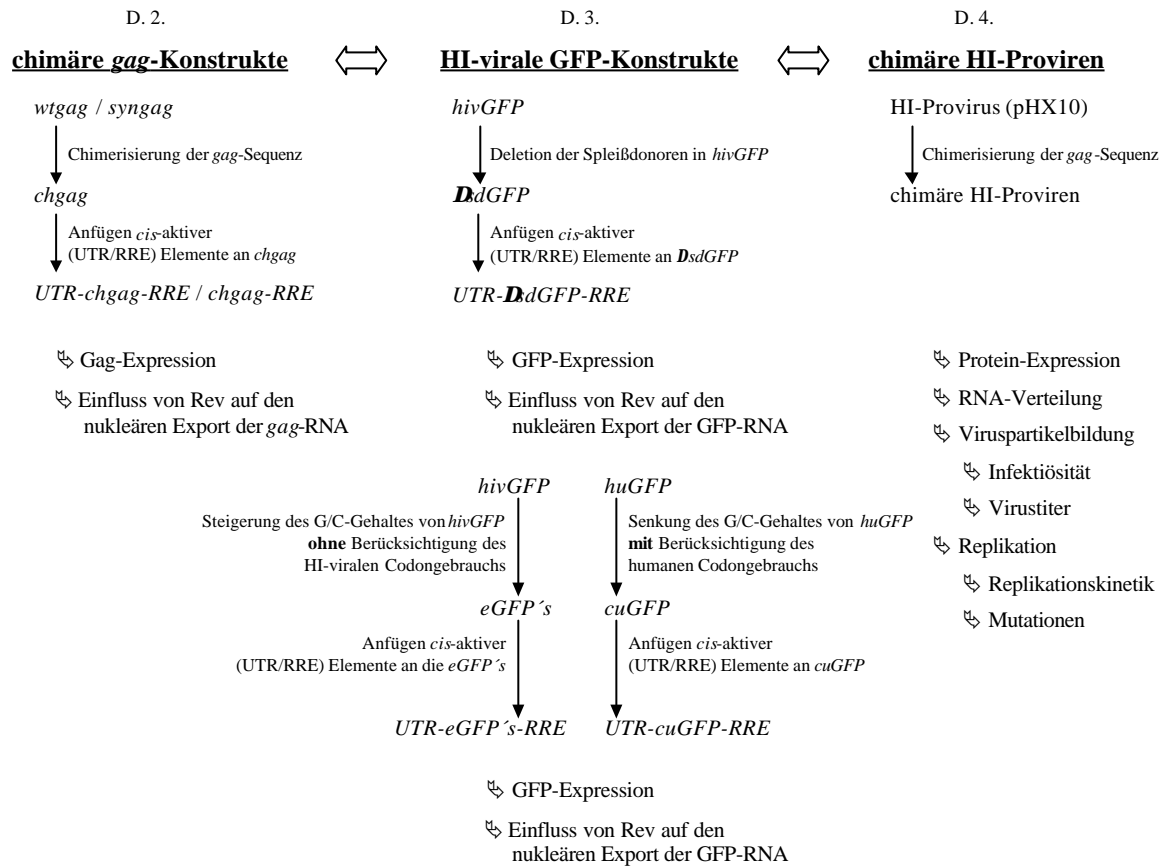


Abbildung D.-1. Gesamtkonzept der Doktorarbeit.

## D.2. Teilkonzept I: Bedeutung des Kodongebrauchs für die Genexpression im Rahmen von chimären gag-Konstrukten

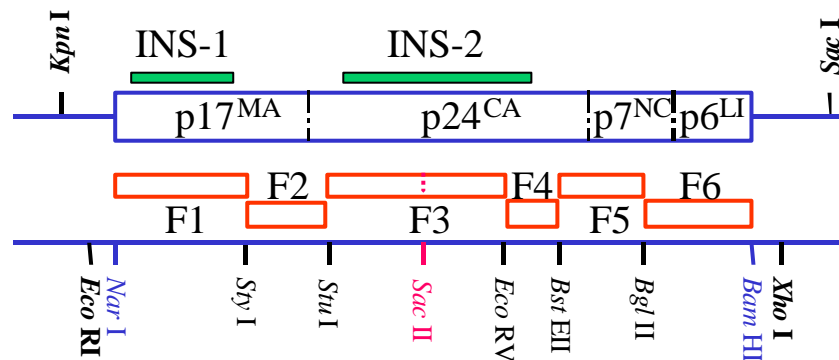
**Hintergrund:** Durch die vorausgegangene Diplomarbeit von Alexandra Bojak („Bedeutung von Spleißstellen und inhibitorischen Sequenzen für die Rev/RRE-abhängige Expression des HIV-1 Pr55<sup>gag</sup>-Polyproteins“, RIMMH 1998) und die Doktorarbeit von Marcus Graf („Untersuchungen über das Zusammenspiel von *cis*-aktiven Sequenzen und viralen tansaktiven Proteinen bei der Expression später HIV-1 Genprodukte: Grundlage zur Entwicklung sicherer und effektiver Vektoren zur DNA-Vakzinierung und lentiviralen Gentherapie“, RIMMH 2000) konnten anhand von Reporterkonstrukten, die alle *cis*-ständige Elemente ungespleißter HIV-Transkripte einschließlich des kompletten Leserahmens des gruppenspezifischen Gag beinhalteten, die minimalen Voraussetzungen für eine Rev-abhängige zeitlich regulierte Expression HI-viraler Gene aufgeklärt werden: In Abwesenheit des 5'-untranslatierten Bereichs oder nach Mutation des 5'-SD (*Splicing Donor*) wurden die Reporterkonstrukte im Zellkern degradiert. Analoge Konstrukte, die den unveränderten 5'-UTR (auf 105 bp verkürzter HIV-1 5'-LTR, der den zentral gelengenen Hauptspleißdonor beinhaltet) enthielten, waren vor der nukleären Degradierung geschützt und akkumulierten im Zellkern. Dies erwies sich als essentielle Voraussetzung für den Rev-abhängigen Export HI-viraler RNAs ins Zytoplasma. Durch Anpassung des Kodongebrauchs innerhalb des *gag*-Gens an hochexprimierte Säugergene konnten zudem alle

postulierten Repressorsequenzen eliminiert und eine konstitutive, nunmehr Rev-unabhängige Expression in Abwesenheit jeglicher *cis*-aktiver Sequenzen erreicht werden. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass diese *Gag*-Transkripte - im Gegensatz zu den Wildtyp-HIV-RNAs - unabhängig von Crm-1 ins Zytoplasma transportiert werden.

## D.2.1. Herstellung und Expression von chimären *gag*-Konstrukten

### D.2.1.1. Herstellung der chimären *gag*-Konstrukte

Ausgehend von den Plasmiden *wtgag* und *syngag* (Beide Klonierungen sind in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits im Detail beschrieben: Wagner *et al.*, 2000; Graf, Doktorarbeit-RIMMH, 2000) sollten chimäre *gag*-Konstrukte entworfen werden, die in unterschiedlicher Zusammensetzung Wildtyp- und synthetische *gag*-Sequenzen und damit auch jeweils einen divergierenden Anteil der postulierten inhibitorischen Sequenzen (INS) beinhalten. Die Wildtyp-*gag*-Sequenz entstammt hierbei dem Klon BH10 des französischen HIV-1 Subtyp-B Isolates LAI/IIIB (accession number: M15654). Das synthetisch hergestellte und dabei auf den Kodongebrauch von Säugetieren optimierte *gag*-Gen (*syngag*) von HIV-1 wurde in sechs Fragmenten mittels PCR erzeugt, subkloniert und schließlich über überlappende Schnittstellen (*sticky ends*) zusammengesetzt (Graf, Doktorarbeit-RIMMH, 2000). *Wtgag* und *syngag* unterscheiden sich nur in ihrer Nukleinsäuresequenz, die zu ca. 74% übereinstimmt. Die daraus resultierende Aminosäuresequenz und das entstehende Gag-Protein sind identisch. Nachfolgende Abbildung gibt einen schematischen Überblick über die Konstruktion von *syngag* und die Lage der postulierten INS innerhalb von *wtgag* wieder.



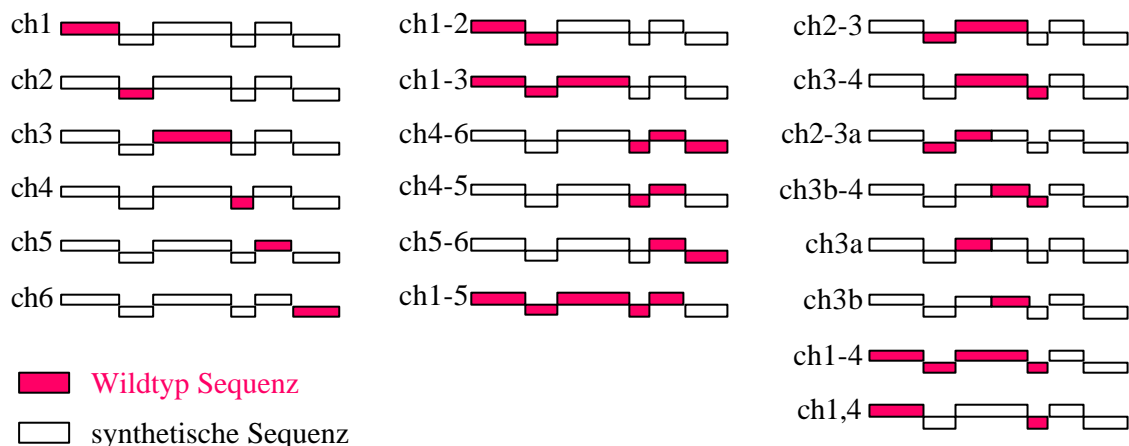
**Abbildung D.-2. Schematischer Überblick über die Konstruktion von *syngag* mittels sechs Subfragmenten, die Lokalisation der Schnittstellen und die Lage der INS innerhalb von *p17<sup>MA</sup>* und *p24<sup>CA</sup>* von *wtgag*.** MA: *matrix protein*, CA: *capsid protein*, NC: *nucleocapsid*, LI: *link protein*, p: *protein*, F: *Fragment*. INS-1 (218 bp; Schwartz *et al.*, 1992), INS-2 (469 bp; Schneider *et al.*, 1997).

Die chimären *gag*-Konstrukte wurden auf der Basis von *syngag* erzeugt, indem jedes einzelne bzw. Kombinationen der Fragmente durch Wildtyp-spezifische Sequenzen ausgetauscht wurden. Die Wildtyp-Fragmente wurden mittels PCR aus *wtgag* amplifiziert (Primersequenz siehe Material). Die erzeugten PCR-Fragmente wurden nach geeignetem Verdau über die entstandenen *sticky ends* in das - mit demselben Enzymen geschnittene - *syngag* Plasmid (in pCR-Script<sup>TM</sup>SK(+)) ligiert.

Betrachtet man die Fragmente und ihre Schnittstellen innerhalb von *syngag*, so ergibt sich folgende Abfolge: *Nar* I - **F 1** - *Sty* I - **F 2** - *Stu* I - **F 3a** - *Sac* II - **F 3b** - *Eco* RV - **F 4** - *Bst* EII - **F 5** - *Bgl* II - **F 6** - *Bam* HI. *Sac* II teilt dabei das relativ lange Fragment 3 (366 nt) in 3a und 3b. Diese Untergliederung wurde deshalb gewählt, um das lange INS-2 Element (469 nt; Schneider *et al.*, 1997) zu zerteilen.

Aus der eben vorgestellten Reihenfolge lassen sich die folgenden Primerpaare mit den ihnen jeweils zugrunde liegenden Schnittstellen für die 20 entworfenen chimären Konstrukte ableiten. A bezeichnet hierbei den „forward“-, B den „revers“-Primer. Die Zahl bei A und B bezeichnet das Fragment, welches amplifiziert wurde. Die Nummerierung von „ch“ gibt das / die Fragment/e an, welche/s innerhalb von *syngag* gegen die Wildtyp-Sequenz ausgetauscht wurde/n; „-“, steht für „bis“; „/“ steht für „und“; „ch“ steht für „chimäres gag“; die chimären Konstrukte sind unterstrichen:

ch1: 1A/1B; ch2: 2A/2B, ch3: 3A/3B; ch4: 4A/4B; ch5: 5A/5B; ch6: 6A/6B; ch1-2: 1A/2B; ch1-3: 1A/3B; ch4-6: 4A/6B; ch4-5: 4A/5B; ch5-6: 5A/6B; ch1-5: 1A/5B; ch1-4: 1A/4B; ch1/4: 4A/4B, das dann in *ch1* kloniert wurde; ch2-3: 2A/3B; ch3-4: 3A/4B; ch2-3a: 2A/3aB; ch3b-4: 3bA/4B; ch3a: 3aA/3aB; ch3b: 3bA/3bB



**Abbildung D.-3. Schematischer Überblick über die chimären gag-Konstrukte.** Ausgehend von den Subfragmenten von *syngag* wurden einzelne Bereiche gegen Wildtyp-Sequenzen ausgetauscht. Rot bezeichnet die HI-virale Wildtyp, weiß die Säugetier-adaptierte Sequenz. Die Fragmente sind versetzt dargestellt um sie besser voneinander abzugrenzen.

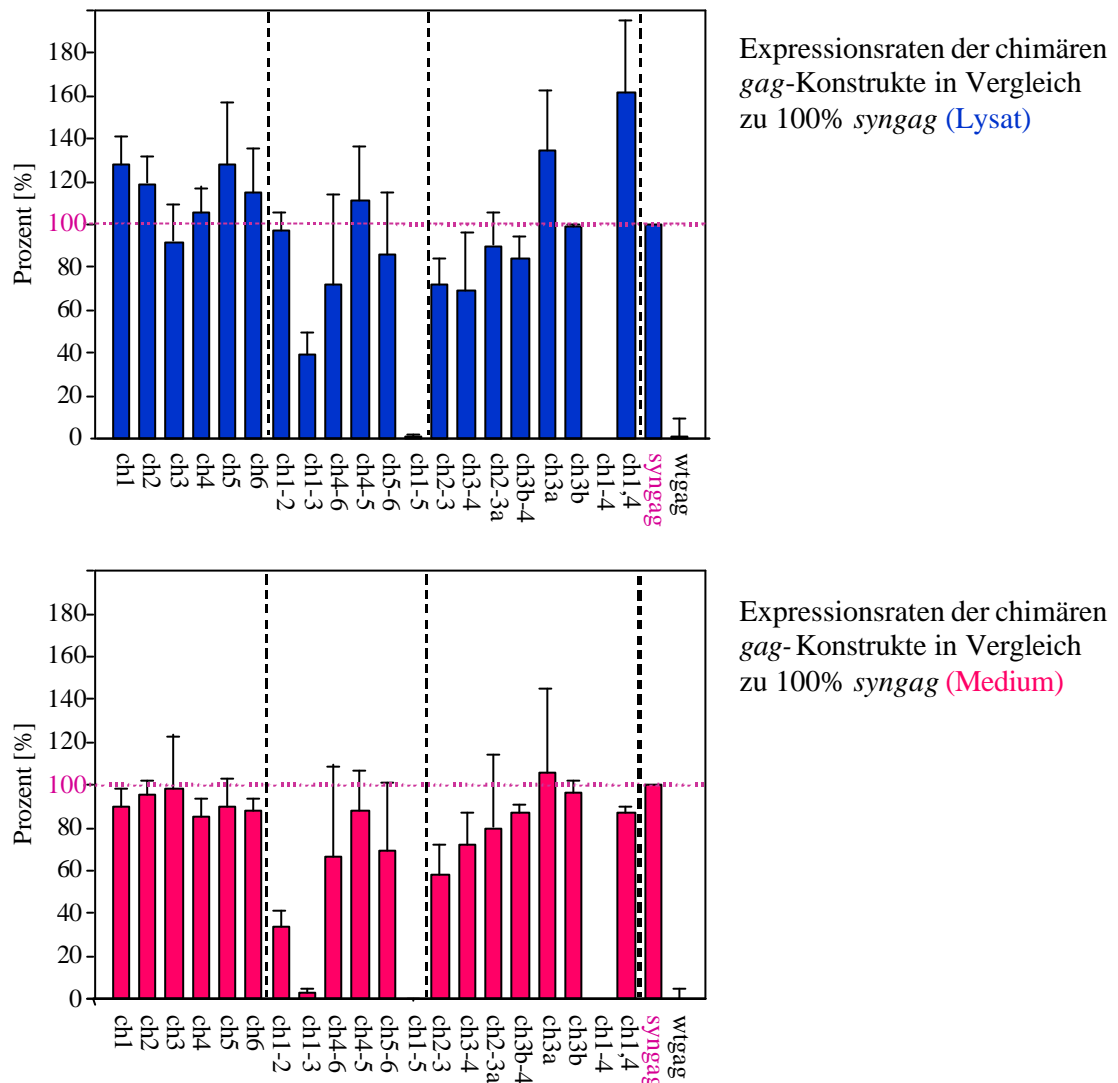
Alle Klonierungen wurden mittels Sequenzierungen überprüft (Sequenzierprimer siehe Material). Die so gewonnenen *pCR-Script-chgag*-Konstrukte wurden zuletzt mit *Eco* RI und *Xho* I verdaut und - nach Auftrennung über ein Agarosegel und Reinigung über *Qiagen*-Säulchen - über diese Schnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert, der über einen CMV-Promoter die Expression vermittelt.

Im Nachfolgenden werden die pcDNA3.1(+)-(ch-, syn-, wt-)gag-Plasmide dem kodierenden Gen entsprechend mit (ch-, syn-, wt-)gag abgekürzt.

#### D.2.1.2. Expression der chimären gag-Konstrukte

Die Expression der verschiedenen gag-Konstrukte wurde anhand transienter Transfektion humaner H1299-Zellen mit *wtgag* (als Negativkontrolle), *syngag* (als Positivkontrolle) und allen zwanzig *chgag*-Plasmide kontrolliert.

Die Zellen und Überstände wurden jeweils nach 48 Stunden geerntet und in einem p24 Capture Assay-ELISA (nach Niedrig) ausgewertet. Die Zelllysate wurden ebenfalls anhand eines Gag-spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert.



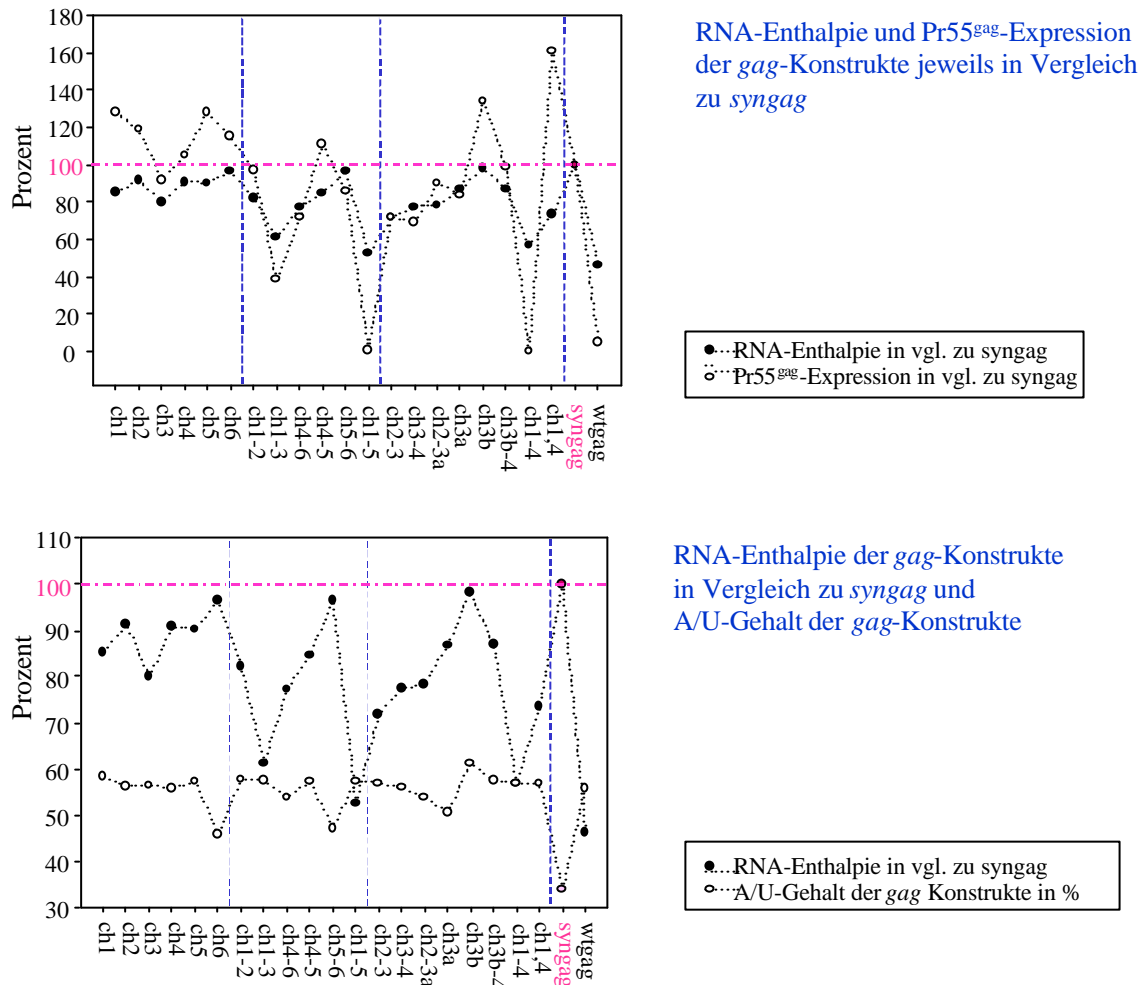
**Abbildung D.-4. Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration im Lysat und Zellkulturüberstand von H1299 Zellen nach Transfektion mit verschiedenen gag-Plasmiden.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit 15 µg Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet bzw. die Zellkulturüberstände gesammelt. Für die interne Standardisierung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Der p24 Capture Assay-ELISA (nach Niedrig) wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Abbildung gibt den Mittelwert mit Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen im Vergleich zu der p24-Expression von syngag (auf 100% gesetzt) wieder (jeweils drei verschiedene DNA-Präparationen in zwei Transfektionen getestet). Die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration lag nach Transfektion mit syngag im Zelllysate bei rund 30 ng/ml, im Medium bei rund 9 ng/ml.

Die Gag-Expression und -Sekretion war nach Transfektion mit den Konstrukten *chl-4*, *chl-5* und *wtgag* sehr schwach oder nicht detektierbar. Transfektion mit *chl-3* führte etwa zu 40% der Pr55<sup>gag</sup>-Expression, die mit *syngag* transfizierte Zellen aufwiesen, und zu einer sehr geringen Gag-Sekretion. Mit *chl-2* transfizierten Zellen hatten dagegen zwar annähernd die selbe Gag-Expression wie die mit *syngag* transfizierten Zellen, dafür war die Gag-Sekretion aber nur etwa 40% von der nach Transfektion mit *syngag* erreichten. Die Zellen, die mit den chimären Konstrukten transfiziert wurden, die im mittleren *gag*-Bereich Wildtyp-Sequenzen aufweisen (*ch2-3*, *ch3-4*, *ch2-3a*, *ch3b-4*), zeigten eine nur leicht verringerte Pr55<sup>gag</sup>-Expression im Vergleich zu den mit *syngag* transfizierten Zellen. Alles im allem zeigt es sich, dass die Länge der Wildtyp-Sequenzen und ihre Position vom 5'-Ende bis zur Mitte des *gag*-Gens einen großen Einfluss auf die Gag-Expression hat. Es konnte kein einzelnes Fragment für eine reduzierte Expression verantwortlich gemacht werden, da alle chimären Konstrukte mit Einzelfragmentaustausch (*chl*, *ch2*, *ch3*, *ch4*, *ch5*, *ch6*, *ch3a*, *ch3b*) nach Transfektion zu einer guten Gag-Expression in den Zellen führten. Insofern muß bei einem Vergleich der Expression nach Transfektion mit *chl-2* und *chl-3* von einem additiven Inhibitionseffekt ausgegangen werden, da diese sich nur in ihrer Sequenz in der Kodonwahl des dritten Fragmentes unterscheiden, Fragment drei alleine (in Form von Konstrukt *ch3*) aber keinen negativen Einfluss auf die Gag-Expression zeigt.

Das HIV-1 Gag-Gen beinhaltet alle Informationen, um nach Expression in eukaryontischen Zellen partikuläre Strukturen an der Plasmamembran auszubilden und Virus-ähnliche Gag-Partikel (*virus-like partikel*, VLP) abzuschnüren. Diese lassen sich dann im Überstand der transfizierten Zellen nachweisen. Die unterschiedlichen Mengen an Pr55<sup>gag</sup> im Transfektionsüberstand entsprachen bei den chimären Konstrukten auch den Unterschieden wie sie im Zelllysats nachweisbar waren, allerdings lag dabei die Pr55<sup>gag</sup>-Sekretion nach Transfektion mit den chimären *gag*-Konstrukten durchschnittlich immer mindestens 20 bis 30% niedriger als die erreichten Pr55<sup>gag</sup>-Konzentrationen im Zelllysats. Eine Ausnahme sind allerdings die Sekretionswerte nach Transfektion mit *chl-2*, die hier bis zu 60% unter der erreichten Expression waren.

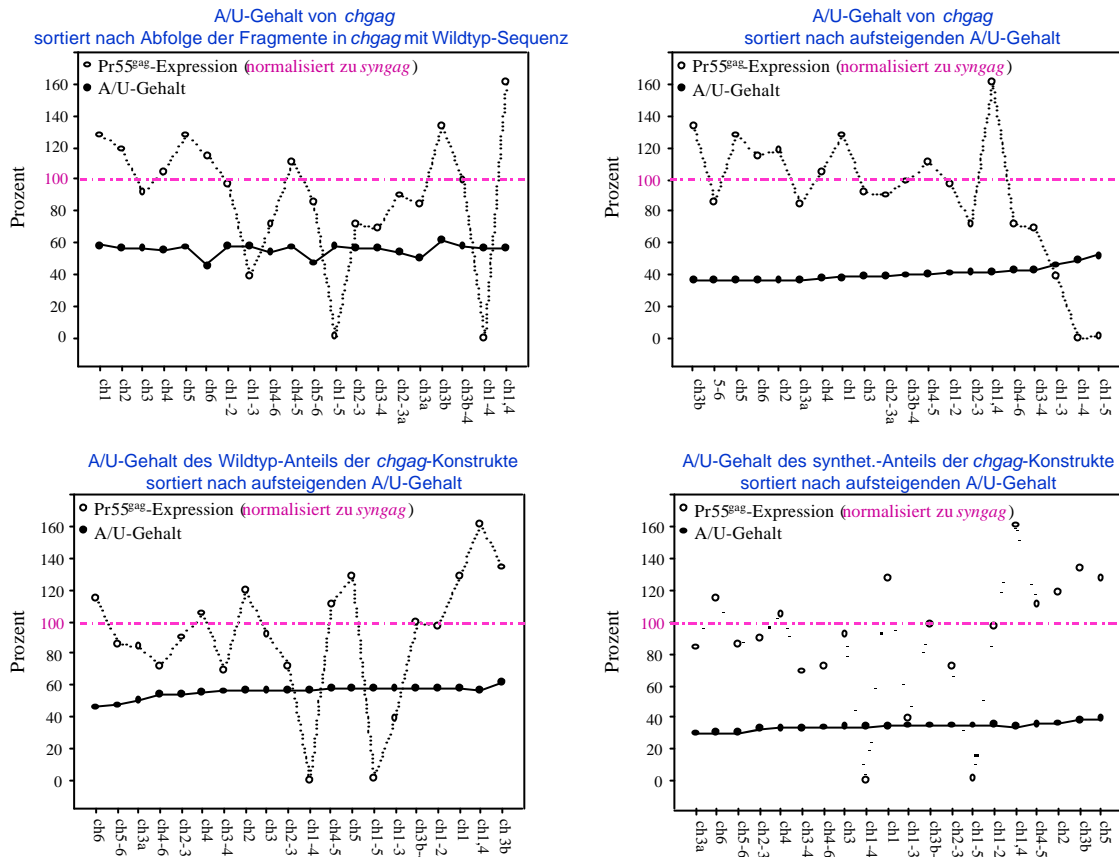
### **D.2.1.3. RNA Enthalpien der chimären gag-Konstrukte**

Vergleicht man die Enthalpie der RNA-Sekundärstruktur der einzelnen *gag*-Konstrukte und setzt die von *syngag* auf 100% (-232,3 kkal/mol), so hat *chl-2* einen Enthalpiewert von 82,18% (-190,9 kkal/mol), *chl-3* einen von 61,26% (-143,3 kkal/mol) und *wtgag* einen von 46,15% (-107,2 kkal/mol) (siehe Grafik D.-5.). Damit kann man die Enthalpie in prozentualer Weise mit anderen Daten vergleichen. Je negativer die Enthalpie ist, desto stabiler ist die RNA-Sekundärstruktur. Deshalb wurde der Wert von *syngag* auf 100% gesetzt. Stellt man dann der Enthalpie die jeweils erreichten Pr55<sup>gag</sup>-Expressionsraten der *gag*-Konstrukte gegenüber, so zeigt sich, dass die Stabilität der RNA-Sekundärstruktur auch einen Einfluss auf die Pr55<sup>gag</sup>-Expressionsrate hat. Betrachtet man dabei den A/U-Gehalt der *gag*-RNA-Sequenzen, so kann man bereits bei geringen Unterschieden im A/U-Gehalt große Enthalpie-Differenzen feststellen. Deshalb muß davon ausgegangen werden, dass sich die verschiedene RNA-Stabilität der *gag*-Konstrukte nicht alleine mit dem A/U-Gehalt ihrer RNA Sequenzen begründen läßt.

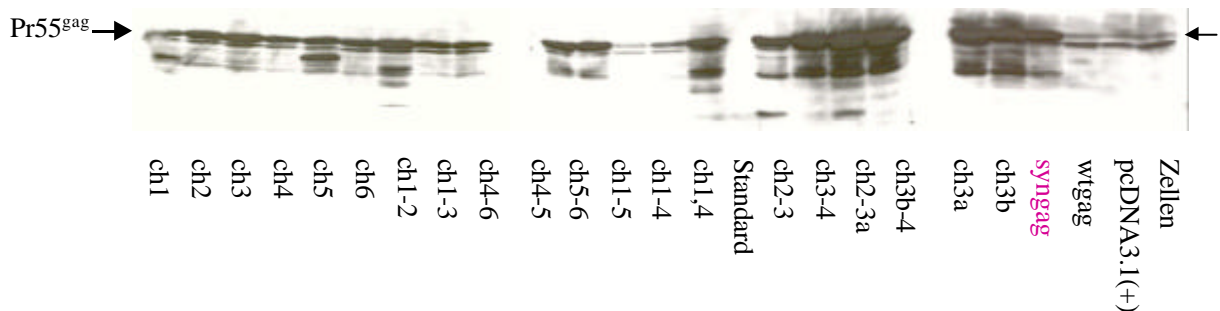


**Abbildung D.-5. Gegenüberstellung der RNA-Enthalpien, Pr55<sup>gag</sup>-Expressionsraten und des A/U-Gehaltes der chimären gag-Konstrukte.** Die RNA-Enthalpien wurden mit Hilfe der Internetseite <http://www.genebee.msu.su> anhand den dortigen Standardeinstellungen berechnet. Der Wert von syngag wurde für die interne Standardisierung auf 100% gesetzt. Im Vergleich dazu sind die jeweils erreichten Pr55<sup>gag</sup>-Expressionsraten der gag-Konstrukte aus den Zelllysaten (oben) angegeben bzw. der A/U-Gehalt der Konstrukte (unten).

Desweiteren können Computeranalysen keinen Zusammenhang zwischen dem A/U-Gehalt der chimären gag-Konstrukte und ihren jeweiligen Expressionswerten aufzeigen (siehe Grafik D.-6.). Anhand dieser Studie konnte ein Positionseffekt identifiziert werden, der darauf hinweist, dass die Kodonwahl in der 5'-Hälfte des Gens einen Einfluss auf die Expression hat (Bei Sortierung nach dem A/T-Gehalt, zeigen die chimären Konstrukte von *ch1* über *ch2* zu *ch3* nach Transfektion eine Abnahme der Pr55<sup>gag</sup>-Expression; ebenso von *ch1-2* zu *ch1-3* bzw. von *ch2-3* zu *ch3-4*.).



**Abbildung D.-6. Gegenüberstellung des A/U-Gehalts und der Pr55<sup>gag</sup>-Expressionsraten der chimären gag-Konstrukte.** Es wurde zum einen nur der A/U-Gehalt des ganzen chimären Konstruktes - sortiert nach der Fragmentreihenfolge (links oben) bzw. nach steigendem A/U-Gehalt (rechts oben), zum anderen der A/U-Gehalt des synthetischen (rechts unten) bzw. nur des auf Wildtyp (links unten) basierenden Sequenzanteils betrachtet.



**Abbildung D.-7. Western Blot.** Am Vortag der Transfektion wurden H1299-Zellen ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte). Am nächsten Tag wurde mit 15 µg Plasmid-DNA die Transfektion nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates erfolgte mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Für die SDS-PAGE wurden pro Ansatz 50 µg Gesamtprotein mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, für drei Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 12,5%-SDS-Gel aufgetragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Das Pr55<sup>gag</sup>-Protein wurde anhand des monoklonalen 16/4/2-Antikörpers und anschließender ECL-Färbereaktion detektiert.



Der Western Blot zeigt die Expression von Pr55<sup>gag</sup> aus H1299-Zellen. Hier konnte die stärkste Expression nach Transfektion mit *ch3-4*, *ch2-3a*, *ch3b-4*, *ch3a*, *ch3b* und *syngag* erzielt werden. Gute Gag-Expressionsraten konnten mit *ch1*, *ch2*, *ch3*, *ch4*, *ch5*, *ch6*, *ch1-2*, *ch4-5*, *ch5-6* und *ch1,4* transfizierten Zellen erreicht werden. Die Pr55<sup>gag</sup>-Expressionen nach Transfektion mit *ch1-4*, *ch1-5* und *wtgag* hingegen lagen auf dem Niveau der Negativkontrollen (leerer Vektor und Zellen). Die Transfektion mit *ch1-2* zeigte im Vergleich zu mit *ch1-3* transfizierten Zellen eine ungefähr zweifach stärkere Gag-Expression. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Testsysteme (p24-ELISA ist sensitiver als Western Blot) und die erreichten Standardabweichungen beim „Capture Assay“, so kann man sagen, dass der Western Blot insgesamt das Ergebnis aus dem p24-ELISA widerspiegelt.

Um die sehr große Anzahl der Konstrukte einzugrenzen, wurden alle weiteren Studien, die den Einfluss *cis*- und *trans*-aktiver Elemente auf die Pr55<sup>gag</sup>-Expression und den Kerntransport der RNA nach Transfektion mit den chimären *gag*-Plasmiden untersuchen sollten, nur noch mit den chimären Konstrukten *ch1-2*, *ch1-3*, *ch3* und *ch4-6* durchgeführt. Erstere haben sich als die interessantesten Konstrukte erwiesen, da - obwohl die Transfektion mit *ch1-3* sehr schlechte Expressionsraten aufzeigt - die mit *ch1-2* sehr hoch sind. Der einzige Unterschied zwischen diesen Konstrukten ist aber die Kodonwahl, die dem Fragment drei zugrunde liegt, deshalb wurde das *ch3* Konstrukt ebenfalls beibehalten. Als Kontrolle innerhalb der chimären *gag*-Plasmide wurde ferner das *ch4-6* Konstrukt verwendet, welches in der Kodonwahl das Spiegelbild von *ch1-3* darstellt.

## **D.2.2. Herstellung und Expression der UTR-chgag-RRE-Konstrukte und nukleärer Export der UTR-chgag-RRE-RNA**

### **D.2.2.1. Herstellung der UTR-chgag-RRE-Konstrukte**

Um den Einfluss *cis*-aktiver Elemente untersuchen zu können, wurden ausgehend von den Plasmiden *UTR-syngag* (in pCR-Script<sup>TM</sup>SK(+)) und *huGFP-RRE* (in pcDNA3.1(+)) (Beide Klonierungen sind in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe im Detail beschrieben: Graf, 2000; Kehlenbeck, 2000) die *UTR-chgag-RRE*-Konstrukte entworfen. Dafür wurden die zuvor hergestellten *chgag*-Vektoren mit *Nar* I und *Bam* HI geschnitten. Das RR-Element (862 bp langes HI-virales Element, das neben 3'-lokalisierten ineffizienten Spleißakzeptorenstellen die RNA-Bindestellen für Rev beinhaltet.) wurde aus *huGFP-RRE* über einen Verdau mit *Bam* HI und *Xho* I gewonnen. Die *syngag*-Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen für *Nar* I und *Bam* HI aus *UTR-syngag* entfernt, so dass ein pCR-Script-Vektor übrigblieb, der bereits das UTR-Element enthielt und über *sticky ends* offen gehalten wurde. Der Vektor (pCR-Script-UTR) als auch beide Inserts (-*chgag*- und -RRE-) wurden nach den jeweiligen präparativen Verdauungen und Auftrennung über ein Agarose-Gel mit anschließender Reinigung über *Qiagen*-Säulchen ligiert. Die so gewonnenen pCR-Script-UTR-chgag-RRE-Konstrukte wurden zuletzt mit *Eco* RI und *Xho* I verdaut und das so gewonnene -UTR-chgag-RRE- Insert wurde - ebenfalls nach Auftrennung und Reinigung - über diese Schnittstellen in pcDNA3.1(+) kloniert. Damit waren die chimären *gag*-Sequenzen

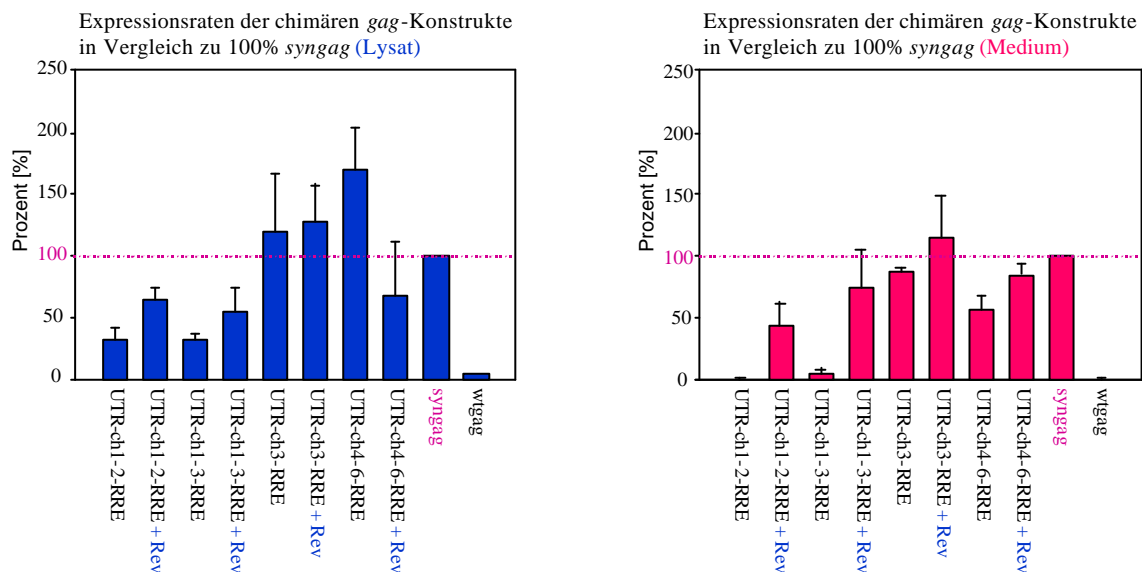
innerhalb des Expressionsvektors von den zwei wichtigen HI-viralen *cis*-aktiven Elementen (5'-SD und 3'-RRE) umgeben.

Im Nachfolgenden werden die pcDNA3.1(+)-UTR-(*ch*-, *syn*-, *wt*-)gag-RRE-Plasmide dem kodierenden Gen entsprechend mit *UTR*-(*ch*-, *syn*-, *wt*-)gag-RRE abgekürzt.

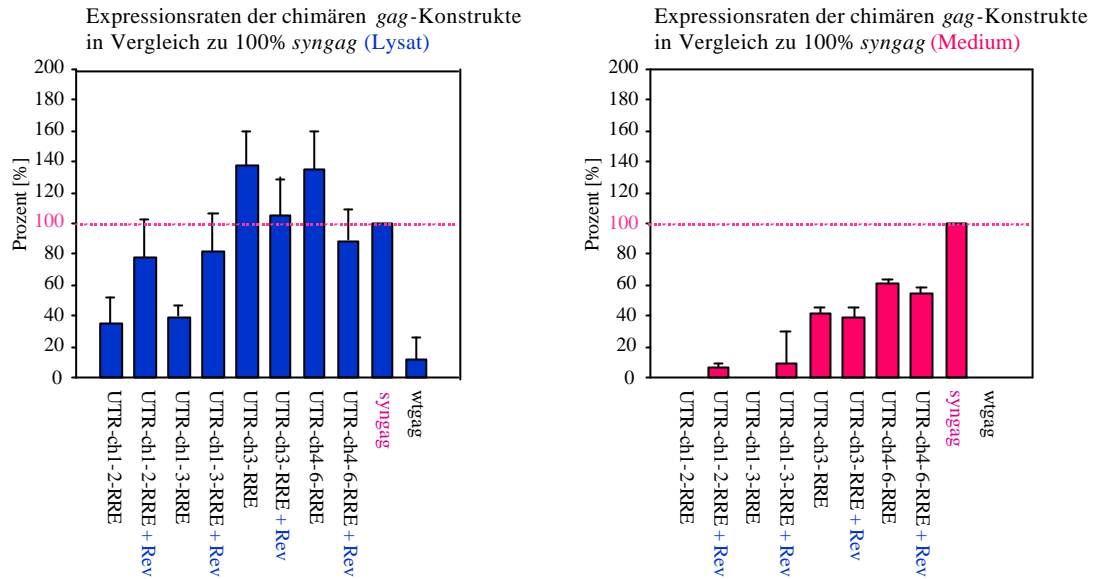
#### D.2.2.2. Expression der UTR-chgag-RRE Konstrukte

Um den Einfluss *cis*-aktiver Elemente auf die Expression der chimären Konstrukte auszutesten und gleichzeitig einen etwaigen Zelltyp-spezifischen Effekt auszuschließen, wurden H1299- (humane Lungenzellen), Cos-7- (Affennierenzellen), C2C12- (Mausmuskelzellen) und NIH-3T3- (Mausfibroblastenzellen) Zellen transient mit *UTR-ch*(1-2, 1-3, 3, 4-6)-RRE und als Vergleichskontrollen mit *wtgag* (als Negativkontrolle) und *syngag* (als Positivkontrolle) aufgrund ihrer bekannten Referenzwerte transfiziert.

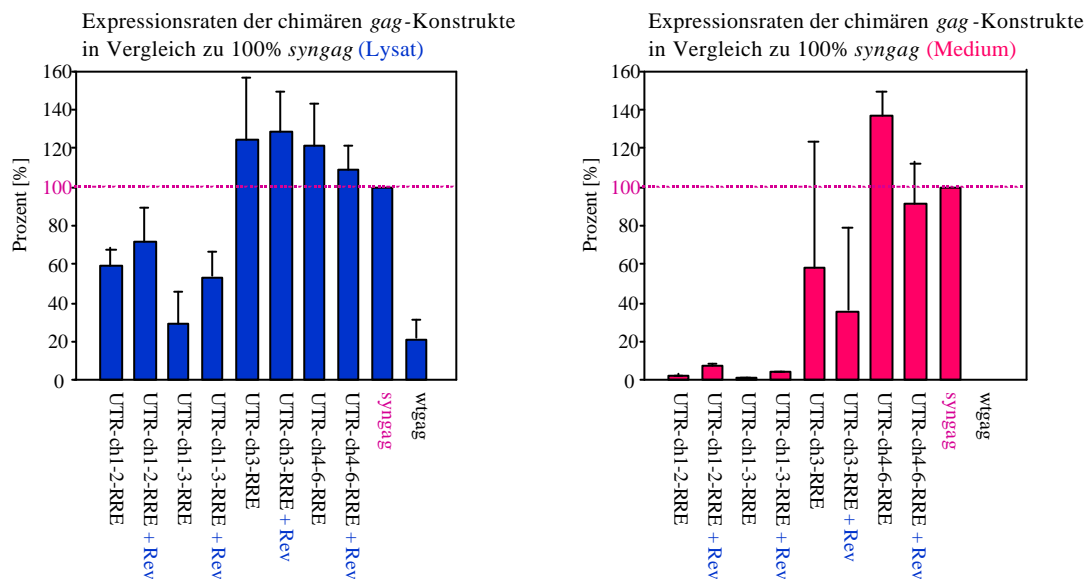
In einer ersten Studie wurde hierfür die Auswirkung der Kotransfektion des Rev-Plasmids (pcRev) auf die Gag-Expression in verschiedenen Zelllinien überprüft. In einem neuen Ansatz wurde dann getestet, inwieweit das transdominante negative Rev-Plasmid (pcRevM10) die Rev-Funktion in H1299-Zellen unterbinden kann. Die Zellen und Überstände wurden jeweils nach 48 Stunden geerntet und in einem p24-ELISA (nach Niedrig) ausgewertet.



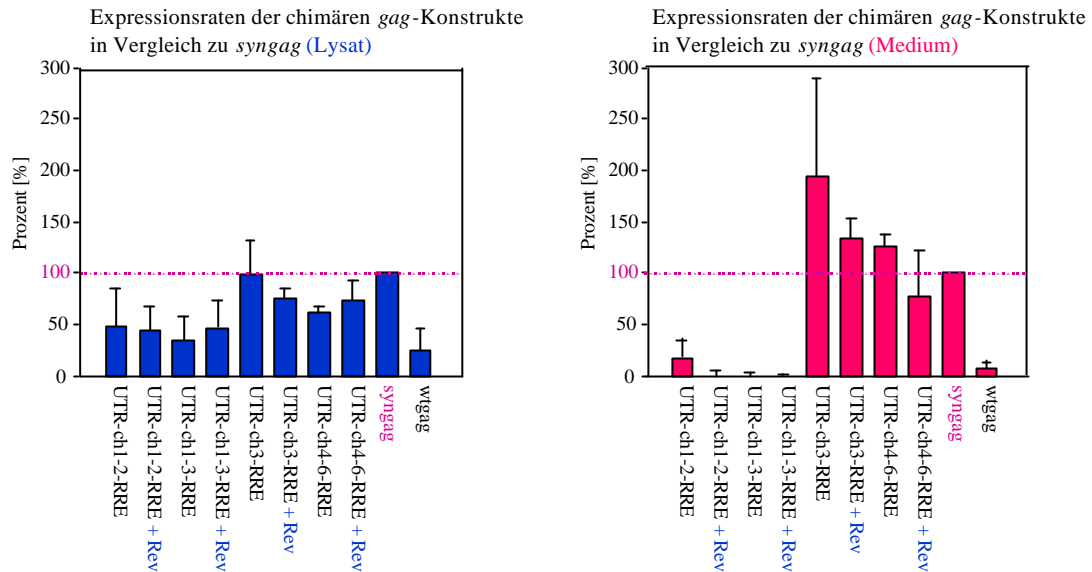
**Abbildung D.-8.1. Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration nach Transfektion von H1299-Zellen mit UTR-gag-RRE [Versuchsbeschreibung siehe nachstehend]. Die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration lag nach Transfektion mit syngag im Zelllysate bei rund 14,5 ng/ml, im Medium bei rund 12 ng/ml.**



**Abbildung D.-8.2.  $Pr55^{gag}$ -Konzentration nach Transfektion von Cos-7-Zellen mit UTR-gag-RRE [Versuchsbeschreibung siehe nachstehend].** Die  $Pr55^{gag}$ -Konzentration lag nach Transfektion mit syngag im Zelllysat bei rund 13 ng/ml, im Medium bei rund 9 ng/ml.



**Abbildung D.-8.3.  $Pr55^{gag}$ -Konzentration nach Transfektion von C2C12-Zellen mit UTR-gag-RRE.** Die  $Pr55^{gag}$ -Konzentration lag nach Transfektion mit syngag im Zelllysat bei rund 7,5 ng/ml, im Medium bei rund 30,5 ng/ml.



**Abbildung D.-8.4. Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration nach Transfektion von NIH-3T3-Zellen mit UTR-gag-RRE.** Die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration lag nach Transfektion mit syngag im Zelllysate bei rund 7 ng/ml, im Medium bei rund 2,5 ng/ml.

**Abbildungen D.-8.1-8.4. Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration im Lysat und Zellkulturüberstand von verschiedenen Zellen nach Kotransfektion von UTR-gag-RRE mit pcRev oder leerem Vektor.** Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen ausgesät (H1299:  $2,5 \times 10^5$ , Cos-7:  $4 \times 10^5$ , C2C12:  $1 \times 10^5$ , NIH-3T3:  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 10 µg UTR-gag-RRE-Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode transfiziert sowie zusätzlich mit 5 µg pcRev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet bzw. die Zellkulturüberstände gesammelt. Für die interne Standardisierung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Der p24 Capture Assay ELISA (nach Niedrig) wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Abbildung gibt den Mittelwert mit Standardabweichung von vier unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen im Vergleich zur Pr55<sup>gag</sup>-Expression von syngag (auf 100% gesetzt) wieder (jeweils zwei verschiedene DNA-Präparationen in zwei Transfektionen getestet).

Ein Vergleich der Zelllinien zeigt, dass die Primatenzellen (H1299, Cos-7) nach Transfektion mit den UTR-chgag-RRE-Konstrukten die selbe Tendenz im Expressionslevel als auch den selben Einfluss von Rev auf die Expressionsrate haben.

Mit UTR-chgag-RRE transfizierte murine Zellen (C2C12, NIH-3T3) zeigen ohne Kotransfektion mit pcRev teilweise niedrigere Gag-Expressionsraten auf als die beiden anderen Zelllinien, die Tendenz innerhalb der Konstrukte (Transfektion mit UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE: mäßig gute Expression, Transfektion mit UTR-ch(3, 4-6)-RRE: teilweise sehr gute Expression) ist aber dieselbe. Im Gegensatz dazu weisen die Nagerzellen nach Kotransfektion mit pcRev nahezu keinen Einfluss des HI-viralen Regulatorproteins auf die Gag-Expression auf. Desweiteren ist die Sekretion von Gag nach Transfektion mit UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE und wtgag in den murinen Zellen sehr schwach. Mögliche Ursachen dafür werden diskutiert. Das von Mariani beschriebene gestört verlaufende Assembly von Gag in murinen Zellen ist außerdem nur bei den NIH-3T3-Zellen nachzuweisen (bezogen auf die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration

im Medium nach Transfektion mit *syngag*), die C2C12-Zellen hingegen zeigen gegenüber den H1299-Zellen eine um mehr als das Doppelte erhöhte Konzentration an Gag im Zellkulturüberstand (wiederum bezogen auf die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration im Medium nach Transfektion mit *syngag*) (Mariani *et al.*, 2000). Dies deutet daraufhin, dass das Assembly von Gag auch von zelltypspezifischen Faktoren beeinflusst wird.

Transfektion mit *UTR-ch1-3-RRE* zeigt in H1299 dieselbe geringe Gag-Expression wie *ch1-3*-transfizierte H1299-Zellen. Ebenfalls sind die Expressionsraten der mit *UTR-ch1-2-RRE* transfizierten Zellen immer niedriger als die nach Transfektion mit *ch1-2* in H1299 erreichten. Die Tendenz der Primatenzellen gegenüber der Expression rund 20 bis 30% niedrigerer Sekretionswerte zu haben, entsprach der Beobachtung nach Transfektion mit den *chgag*-Konstrukten in H1299-Zellen. Auffällig ist hier allerdings, dass nach Transfektion mit *UTR-ch1-2-RRE* und *UTR-ch1-3-RRE* von beiden Primatenzellen nahezu keine Gag-Partikel freigesetzt werden. Erst nach Kotransfektion mit pcRev kommt es hier zumindest bei den H1299-Zellen zu einer deutlichen Gag-Sekretion.

Desweiteren konnte in den Primatenzellen gezeigt werden, dass die Gag-Expression der mit *UTR-ch1-2-RRE* und *UTR-ch1-3-RRE* transfizierten Zellen nach Kotransfektion mit pcRev gesteigert werden konnten, während die der mit *UTR-ch3-RRE* und *UTR-ch4-6-RRE* transfizierten Zellen annähernd gleich blieben oder zurückgingen. Dies deutet darauf hin, dass der Wildtyp-Sequenzanteil am 5'-Ende der chimären Konstrukte für die Rev-abhängige Expression unter gleichzeitigen Einfluss der *cis*-aktiven Elemente verantwortlich ist.

Die Inhibition der Funktion von Rev durch RevM10 beruht darauf, dass diese Mutante mit Rev um die RRE-Bindestellen konkurriert, aufgrund des Austausches von Aminosäuren innerhalb seiner NES Sequenz aber nicht mehr mit Crm-1 interagieren kann, woraufhin der Rev-abhängige RNA Kernexport konzentrationsabhängig unterbunden wird. Deshalb sollte in einem weiteren Versuch die Wirkung von RevM10 auf die Expression von *UTR-chgag-RRE* untersucht werden.

**Abbildung D.-9. Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration im Lysat und Zellkulturüberstand von H1299-Zellen nach Kotransfektion von UTR-gag-RRE mit pcRev oder pcRev/pcRevM10.** Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte). Am nächsten Tag wurde mit 12 µg UTR-gag-RRE-Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode transfiziert sowie zusätzlich mit 6 µg pcRev und leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) oder mit 6 µg pcRev und pcRevM10 jeweils im Verhältnis 1:3 kotransfiziert (Die Kontrolltransfektionen von gag und UTR-gag-RRE erfolgten jeweils mit 18 µg DNA). Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet bzw. die Zellkulturüberstände gesammelt. Für die interne Standardisierung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Der p24 Capture Assay ELISA (nach Niedrig) wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Abbildung gibt den Mittelwert mit Standardabweichung von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen im Vergleich zur Pr55<sup>gag</sup>-Expression von *syngag* (auf 100% gesetzt) wieder (jeweils zwei verschiedene DNA-Präparationen in einer Transfektionen getestet). Die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration lag nach Transfektion mit *syngag* im Zelllysate bei rund 20 ng/ml.

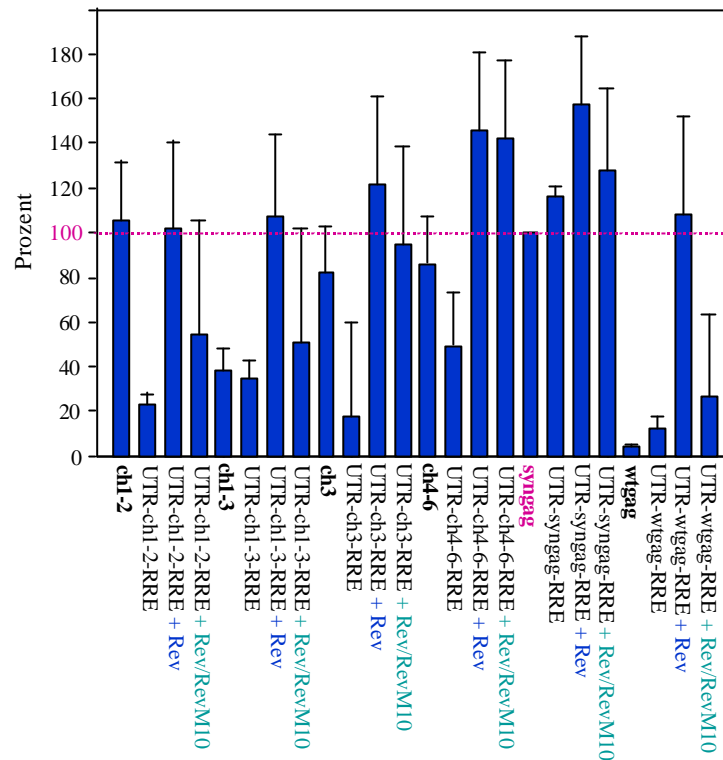


Abbildung D.-9.

Mit Hilfe dieses Versuches konnten die Ergebnisse der vorausgegangenen Studie bestätigt werden. Nur mit *UTR-ch(3, 4-6)-RRE* und *UTR-syngag-RRE* transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu der Kotransfektion mit pcRev keine große Inhibitionswirkung von RevM10 auf die Gag-Expression. Dagegen reagierten mit *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE* transfizierte Zellen sensitiv. Die Gag-Expression der mit *UTR-wtgag-RRE* transfizierten Zellen verminderte sich nach Kotransfektion mit pcRev/pcRevM10 sogar um 60%. Auch dies ist ein Indiz dafür, dass der Wildtyp-Sequenzanteil am 5'-Ende der chimären Konstrukte für die Rev-abhängige Expression verantwortlich ist. Berücksichtigt man ferner hier die Pr55<sup>gag</sup>-Expressionswerte nach Transfektion mit *ch1-2* und *UTR-ch1-2-RRE*, so kann daraus geschlossen werden, dass die HI-virale Rev-abhängige Expression sich in dem Zusammenspiel von *cis*- und *trans*-aktiven Elementen begründet.

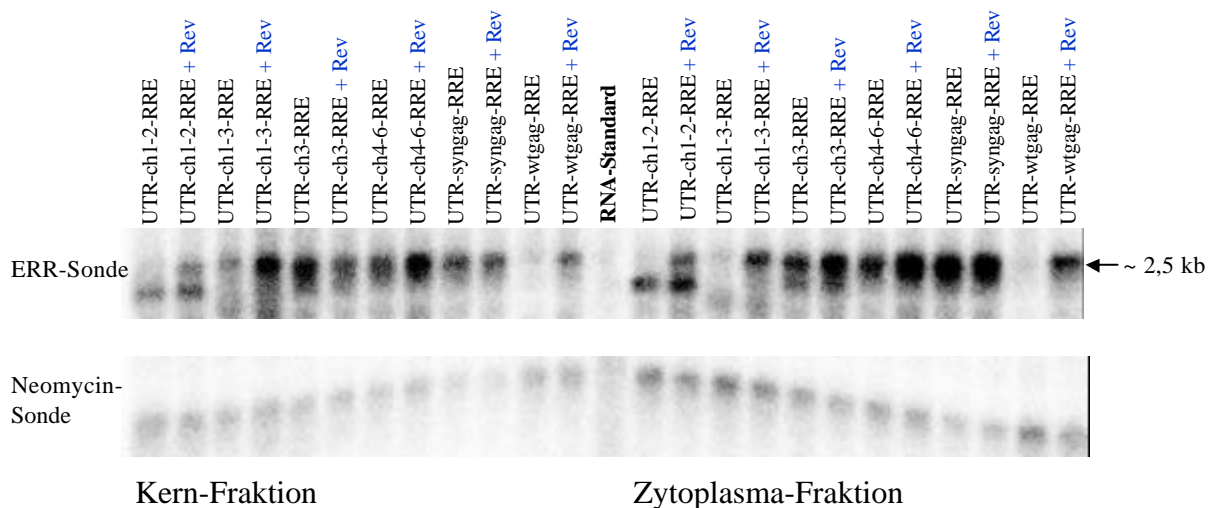
Die Pr55<sup>gag</sup>-Expression nach Transfektion mit *UTR-ch(3, 4-6)-RRE* (ohne Kotransfektion mit pcRev) zeigt gegenüber der mit *ch(3, 4-6)* transfizierten Zellen eine deutliche Reduzierung. Im Vergleich zu mit *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*, *UTR-syngag-RRE* und *UTR-wtgag-RRE* (jeweils auch ohne Kotransfektion) transfizierten Zellen haben die Ergebnisse der Transfektionen mit *UTR-ch(3, 4-6)-RRE* hier die größten Standardabweichungen. Deshalb wird vermutet, dass diese Beobachtung auf eine ineffizientere Transfektionsrate zurückzuführen sind, da dies bei dem vorausgehenden Versuch (Abbildung D.-8.1.) nicht beobachtet wurde. Die Steigerung der Expression von mit pcRev kotransfiziertem *UTR-syngag-RRE*-transfizierten Zellen, im Vergleich zu der mit *syngag* transfizierten Zellen, kann dadurch erklärt werden, dass durch das Anfügen der HI-viralen *cis*-aktiven Elemente der RNA dieses Konstruktes zusätzlich auch der Crm-1-abhängige Kernexportweg nach Kotransfektion mit pcRev zur Verfügung steht. Deshalb ist die Pr55<sup>gag</sup>-Expression nach Transfektion mit dem *UTR-syngag-RRE*-Plasmid nach Inhibition mit RevM10 wieder

annähernd auf demselben Niveau wie die mit *syngag* transfizierten Zellen (unter Berücksichtigung der erreichten Standardabweichung).

### D.2.2.3. Einfluss von Rev auf den nukleären Export der UTR-*ch*gag-RRE-RNA

In früheren Studien (Graf *et al.*, 2000) konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Eliminierung der postulierten INS-Elemente innerhalb von *gag* durch Kodonadaptierung an hochexprimierende Säugetiergene (*syngag*) dieses Transkript in eine RNA-Spezies transformiert, die einen zum Wildtyp (*wtgag*) verschiedenen Kernexportweg benutzt. Darüber hinaus ist die Gag-Expression ausgehend vom *syngag*-Plasmid unabhängig von der Anwesenheit des 5'-Spleißdonors und des Rev/RRE-Systems. Deshalb sollte in einer weiteren Studie der Kernexportweg der UTR-*ch*gag-RRE-Konstrukte betrachtet werden. Hierfür wurden H1299-Zellen transient mit UTR-*ch*(1-2, 1-3, 3, 4-6)-RRE, UTR-*syngag*-RRE und UTR-*wtgag*-RRE transfiziert. Die Kotransfektion erfolgte in einem ersten Ansatz entweder mit dem Rev-Plasmid oder mit pcDNA3.1(+), in einem zweiten Ansatz entweder mit dem Rev-Plasmid oder wieder mit einer Kombination von pcRev und pcRevM10. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion separiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Northern Blot anhand Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten ERR-Sonde, die zur RRE-Sequenz komplementär war.

Für die Vergleichbarkeit der Transfektionseffizienz wurde die RNA in einem weiteren Auftrag mit einer Sonde hybridisiert, die spezifisch an die Neomycin-RNA bindet. Dieses Gen liegt auf dem pcDNA3.1(+) Vektor. Daher liegt die Neomycin-RNA nur in Zellen vor, die erfolgreich transfiziert wurden.



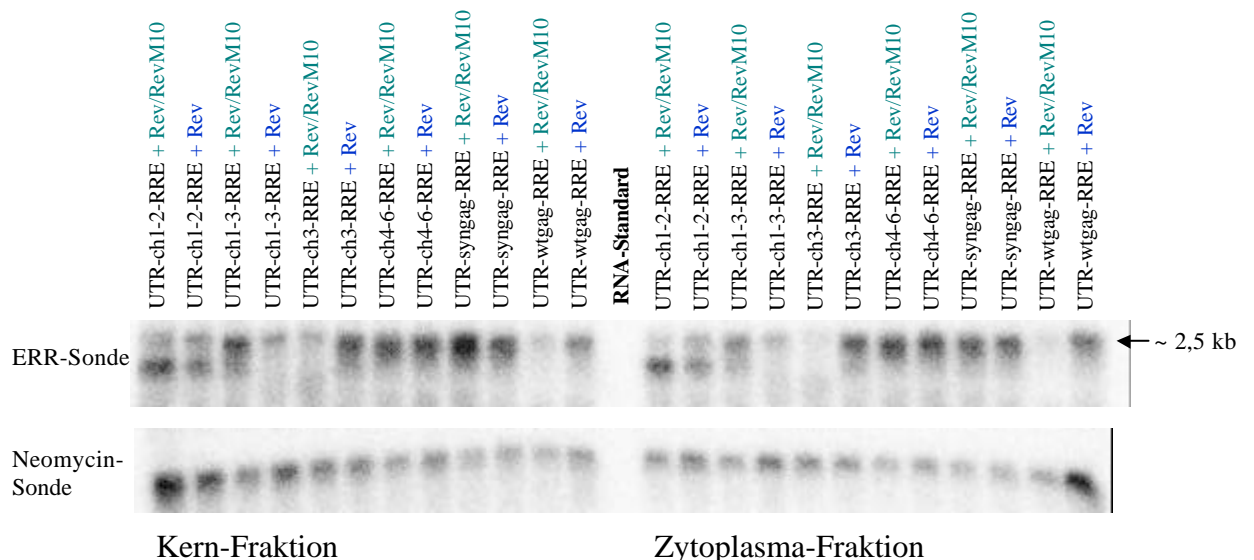
**Abbildung D.-10. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fractionen nach Kotransfektion von UTR-gag-RRE mit pcRev bzw. leerem Vektor.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale). Am nächsten Tag wurde mit  $30 \mu\text{g}$  UTR-gag-RRE-Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode transfiziert sowie zusätzlich mit  $15 \mu\text{g}$  pcRev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Der Northern Blot wurde wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt. (Anmerkung: Der Auftrag der Neomycin-Sonde in Form eines Bogens beruht auf einer thermischen Verformung des Spurenkammes während der Herstellung des Agarose-Geles.)



Die nach Transfektion mit *UTR-ch(3, 4-6)-RRE* isolierten RNAs zeigen unabhängig von Rev - ausgehend von ihrer doch unterschiedlichen nukleären Konzentration - dieselbe Exporteffizienz wie die RNAs aus mit *UTR-syngag-RRE* transfizierten Zellen. Dagegen ist der Transport der RNA nach Transfektion mit *UTR-ch1-3-RRE* vom Kern ins Zytoplasma nur nach erfolgter Kotransfektion mit pcRev detektierbar. Die Kernstabilität der *UTR-ch1-3-RRE*-RNA ist mit der *UTR-wtgag-RRE*-RNA vergleichbar. Die spezifische gag-RNA-Bande aus mit *UTR-ch1-2-RRE* transfizierten Zellen ist erst deutlich nach Kotransfektion mit pcRev im Kern nachzuweisen. Dagegen kann man bei dieser Transfektion im Northern Blot immer eine etwas weniger weit als die *UTR-gag-RRE*-RNA (~2500 nt) laufende weitere RRE-haltige RNA detektieren, die auch in das Zytoplasma - unabhängig von Rev - exportiert wird. Der Nachweis der geringen Gag-Expression nach Transfektion mit *UTR-ch1-2-RRE* trotz „fehlender“ RNA kann dadurch erklärt werden, dass der p24 Capture Assay-ELISA empfindlicher ist als die Northern Blot-Analyse.

Nach Kotransfektion mit pcRev zeigt sich der bekannte RNA-Stabilisierungseffekt von Rev; in geringem Ausmaß bei den *UTR-ch(1-2, 3, 4-6)-RRE*- und *UTR-syngag-RRE*-RNAs, stärker bei der *UTR-ch1-3-RRE*- und am stärksten bei der *UTR-wtgag-RRE*-RNA. Desweiteren werden die gag-RNAs mit *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE* und *UTR-wtgag-RRE* transfizierten Zellen erst nach Kotransfektion mit pcRev effektiv in das Zytoplasma transportiert. Damit korrelierten die zytoplasmatische RNA-Verteilung nach Transfektion mit den *UTR-gag-RRE*-Konstrukten aus der Northern Blot-Analyse mit den zuvor erreichten Pr55<sup>gag</sup>-Expressionswerten.

Anschließend sollte in einem zweiten Ansatz untersucht werden, wieweit RevM10 den Kernexport der *UTR-gag-RRE*-Konstrukte unterbinden kann.



**Abbildung D.-11. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von *UTR-gag-RRE* mit pcRev oder pcRevM10.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale). Am nächsten Tag wurde mit  $30 \mu\text{g}$  *UTR-gag-RRE*-Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode transfiziert sowie zusätzlich mit  $15 \mu\text{g}$  pcRev und leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) oder pcRev und pcRevM10 jeweils im Verhältnis 1:3 kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Der Northern Blot wurde wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt.



Bei dieser Studie muss das Verhältnis der zytoplasmatischen RNAs beider Kotransfektionen unter Berücksichtigung ihres zugrundeliegenden Kernverhältnisses betrachtet werden. Die RNAs aus mit *UTR-ch(3, 4-6)-RRE* und *UTR-syngag-RRE* transfizierten Zellen zeigen keinen Einfluss auf ihren Kern-Zytoplasma Transport nach Kotransfektion mit pcRev/pcRevM10. Aus *UTR-ch1-2-RRE* transfizierten Zellen kann nach Kotransfektion mit pcRev/pcRevM10 vor allem wieder die etwas weniger weit als *UTR-gag-RRE*-RNA laufende weitere RRE-haltige RNA detektiert werden, deren Export aber nicht durch RevM10 inhibiert wird. Der Transport der schwach erkennbaren spezifischen *gag*-Bande aus mit *UTR-ch1-2-RRE* transfizierten Zellen wird dagegen durch RevM10 gehemmt. Desweiteren weisen die *UTR-ch1-3-RRE*- und *UTR-wtgag-RRE*-RNAs eine sehr starke Inhibition ihres nukleären Exportes nach Kotransfektion der Zellen mit pcRev/pcRevM10 auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Wildtyp-Sequenz innerhalb der ersten drei Fragmente in den chimären Konstrukten für den Rev-abhängigen Transport der *UTR-wtgag-RRE*-RNA verantwortlich ist.

Bemerkenswert ist, dass man nach Transfektion mit *UTR-ch1-2-RRE* in allen Northern Blot-Analysen eine zweite ERR-spezifische Bande detektieren kann, die in geringem Maße auch nach Transfektion mit *UTR-ch1-3-RRE* auftritt (Bande nur auf Kodak-Filmen erkennbar und kaum im Phosphor-Imager-Scanner). Interessant ist auch das Verhältnis der Doppelbanden der *UTR-ch1-2-RRE*-RNAs nach unterschiedlichen Kotransfektionen: Mit Kotransfektion mit leerem Vektor ist nur die tiefer laufende RNA-Bande zu detektieren, mit pcRev ist das Verhältnis der Bandenstärken etwa ausgeglichen, mit pcRev/pcRevM10 dagegen etwa 1:5 für die kleinere RNA-Bande. Aufgrund der Spezifität (Nachweis mit ERR-Sonde) ist hier von einem Spleißprodukt auszugehen. Da man desweiteren durch Inhibition des Rev-abhängigen Kerntransportes das Spleißereignis erhöhen kann, kann weiter davon ausgegangen werden, dass die HI-virale Regulation ein Zusammenspiel zwischen Transport- und Spleißfaktoren darstellt. Mit dieser Vermutung könnte auch der Unterschied zwischen den Expressionsraten nach Transfektion mit *ch1-2* (hoch) und *UTR-ch1-2-RRE* (niedrig) in H1299-Zellen erklärt werden. Die *UTR-ch1-2-RRE*-RNA wird gespleißt, weshalb dessen Gag-Expression nicht mit der mit *ch1-2* transfizierten Zellen vergleichbar ist. Northern Blot-Studien nach Transfektion mit *UTR-ch1-3-RRE* zeigen ebenfalls dieses Spleißprodukt. Allerdings ist die Gag-Expression schon nach Transfektion mit *ch1-3* sehr gering. Dies weist ebenfalls darauf hin, dass die Wildtyp-Sequenz innerhalb von *ch1-3* für die niedrige Transkription und den Rev-abhängigen Export des/r *UTR-wtgag-RRE*-Plasmides/RNA neben *cis*-aktiven Elementen verantwortlich ist.

### **D.2.3. Herstellung und Expression der *chgag-RRE*-Konstrukte und nukleärer Export der *chgag-RRE*-RNA**

#### **D.2.3.1. Herstellung der *chgag-RRE*-Konstrukte**

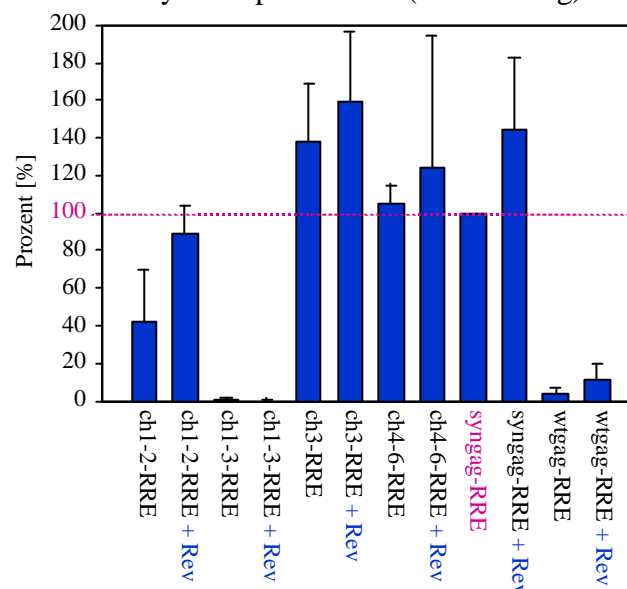
Ausgehend von den Plasmiden *chgag* (in pCR-Script<sup>TM</sup>SK(+)), *huGFP-RRE* (in pcDNA3.1(+)) und dem pcDNA3.1(+)-Vektor wurden die *chgag-RRE*-Konstrukte entworfen, um den Einfluss des 5'-Spleißdonors (im UTR) auf die Expression und den RNA-Export bewerten zu können. Dafür wurden die zuvor hergestellten *chgag*-Plasmide mit *Eco* RI und *Bam* HI geschnitten. Das RR-Element wurde aus *huGFP-RRE* über einen Verdau mit *Bam* HI und *Xho* I gewonnen. Der pcDNA3.1(+)-Vektor wurde schließlich

über *Eco* RI und *Xho* I geöffnet. Der Vektor als auch beide Inserts (-*chgag*- und -RRE-) wurden nach den jeweiligen präparativen Verdauungen und Auftrennung über ein Agarose-Gel mit anschließender Reinigung über *Qiagen*-Säulchen ligiert. Damit waren die chimären *gag*-Sequenzen am 3'-Ende vom HI-viralen RRE begrenzt.

Im Nachfolgenden werden die pcDNA3.1(+)-(ch-, syn-, wt-)*gag*-RRE-Plasmide dem kodierenden Gen entsprechend mit (ch-, syn-, wt-)*gag*-RRE abgekürzt.

### D.2.3.2. Expression der *chgag*-RRE-Konstrukte

Bereits in einer früheren Studie (Graf *et al.*, 2000) konnten wir zeigen, dass die Expression von *wtgag* von der Anwesenheit von RRE (beinhaltet eine Vielzahl ineffizienter Spleißakzeptorenstellen), Rev und dem 5'-SD (als Bestandteil des UTR-Elementes) abhängig ist, da die Expression der späten HIV-1-Genprodukte von der Effizienz der Benutzung von Spleißstellen beeinflusst wird. So konnte eine Gag-Expression bei mit *UTR-wtgag* und *wtgag*-RRE transfizierten Zellen - auch nach Kotransfektion mit pcRev - nicht nachgewiesen werden. Dagegen ist die Expression des *syngag*-Plasmides unabhängig von *cis*- und *trans*-aktiven Elementen. Um den Einfluss des 5'-Spleißdonors auf die Gag-Expression analysieren zu können, wurden H1299-Zellen mit *ch*(1-2, 1-3, 3, 4-6)-RRE, *syngag*-RRE und *wtgag*-RRE transient transfiziert. Die Kotransfektion erfolgte hier entweder mit dem Rev-Plasmid oder dem leeren Vektor. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und das Proteinlysate im p24-ELISA (nach Niedrig) ausgewertet.



**Abbildung D.-12. Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration im Lysat von H1299-Zellen nach Kotransfektion von *gag*-RRE mit pcRev.** Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte). Am nächsten Tag wurde mit 10 µg Plasmid-DNA die Transfektion nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode durchgeführt. Die Kotransfektion erfolgte mit 5 µg pcRev bzw. leerem Vektor (pcDNA3.1(+)). Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Für die interne Standardisierung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Der p24 Capture Assay ELISA (nach Niedrig) wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Abbildung gibt den Mittelwert mit Standardabweichung von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen im Vergleich zu der Pr55<sup>gag</sup>-Expression von *syngag*-RRE (auf 100% gesetzt) wieder (jeweils zwei verschiedene DNA-Präparationen in einer Transfektion getestet). Die Pr55<sup>gag</sup>-Konzentration lag nach Transfektion mit *syngag*-RRE im Zelllysate bei rund 50 ng/ml.

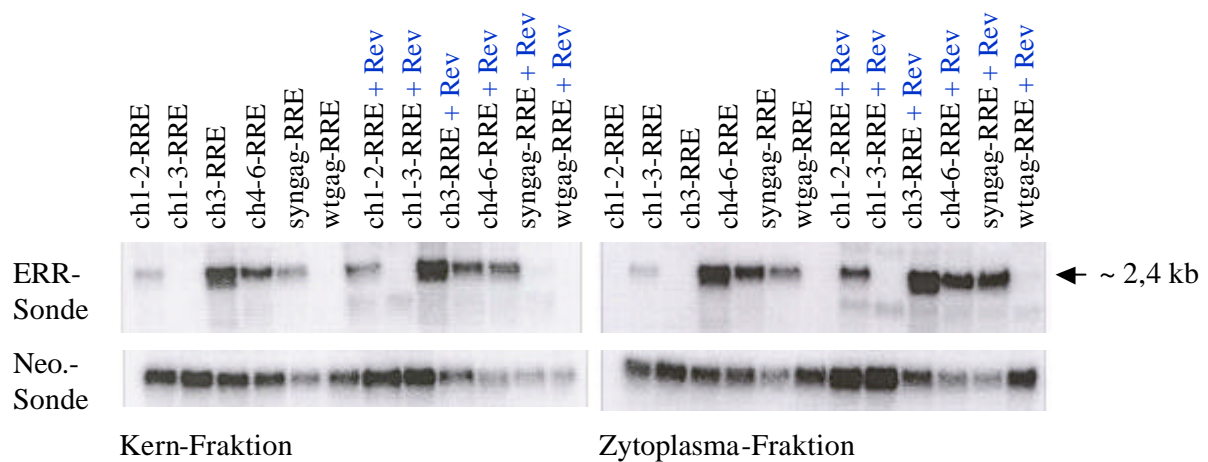
Die Gag-Expressionsraten mit *ch(3, 4-6)-RRE* transfizierten Zellen übersteigen ohne Kotransfektion mit pcRev bereits den erreichten Wert von mit *syngag-RRE* transfizierten Zellen. Nach Kotransfektion mit pcRev kann die Gag-Expression von mit *ch(3, 4-6)-RRE* und *syngag-RRE* transfizierten Zellen jeweils um mindestens 20% gesteigert werden. Die p24-Expression des Plasmid *ch1-2-RRE* erreicht ohne Kotransfektion mit pcRev ungefähr 40% der Expressionsrate der mit *syngag-RRE* transfizierten Zellen. Nach Kotransfektion mit pcRev sind die Expressionswerte mit *ch1-2-RRE* transfizierten Zellen mit denen von *syngag-RRE* transfizierten Zellen vergleichbar. Die Gag-Expression mit *ch1-3-RRE* transfizierten Zellen dagegen bleibt selbst nach Kotransfektion mit pcRev immer unter der mit *wtgag-RRE* transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Gag-Expression von HIV neben ineffizienter Spleißstellen auch durch Sequenzmotive innerhalb der *gag*-RNA-Sequenz beeinflusst wird. Hierbei muss - aufgrund der unterschiedlichen Expressionswerte nach Transfektion mit *ch1-2-RRE* (mittelmäßige Expression), *ch1-3-RRE* (schlechte Expression) und *ch3-RRE* (gute Expression) - von einem additiven Effekt ausgegangen werden, da sich die jeweiligen Plasmide in der Kodonwahl ihrer zugrundeliegenden Fragmente unterscheiden.

Vergleicht man zudem die Wirkung von Rev auf die Expressionswerte nach Transfektion mit *ch(1-2, 1-3)-RRE* mit denen nach Transfektion mit *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*, so zeigt sich bei „ch1-2“ jeweils nach Kotransfektion mit pcRev eine deutliche Expressionssteigerung. Bei „ch1-3“ hingegen kann dies nur in Anwesenheit von UTR und RRE beobachtet werden. Die Gag-Expression mit *ch1-3-RRE* transfizierten Zellen wiederum bleibt auch nach Kotransfektion mit pcRev unterhalb des Wildtyp Niveaus. Dies ist ein Indiz für die Bedeutung der 5'-Spleißdonorstellen bei der post-transkriptionellen Regulation von HIV-1.

#### **D.2.3.3. Einfluss von Rev auf den nukleären Export der *chgag-RRE-RNA***

Nachfolgend sollte der RNA-Transport der *chgag-RRE*-Konstrukte aufgeklärt werden. Dafür wurden H1299-Zellen transient mit *ch(1-2, 1-3, 3, 4-6)-RRE*, *syngag-RRE* und *wtgag-RRE* transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion separiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Northern Blot anhand Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten ERR-Sonde, die zur RRE-Sequenz komplementär ist. Für die Vergleichbarkeit der Transfektionseffizienz wurde die RNA in einem zweiten Auftrag mit einer Sonde hybridisiert, die spezifisch an Neomycin-RNA bindet. Der pcDNA3.1(+) Vektor beinhaltet das Neomycingen unter einem konstitutiven Promoter. Damit liegt die Neomycin RNA nur in Zellen vor, die erfolgreich transfiziert wurden.

**Abbildung D.-13. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von *gag-RRE* mit pcRev bzw. leerem Vektor [Abbildung und Beschreibung siehe Extra-Blatt – Seite 59a].**



**Abbildung D.-13. Northern Blot Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von gag-RRE mit rev bzw. leerem Vektor.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale). Am nächsten Tag wurde mit  $30 \mu\text{g}$  gag-RRE Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode transfiziert sowie zusätzlich mit  $15 \mu\text{g}$  rev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Der Northern Blot wurde wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt.

Der nukleäre Export der *ch(3, 4-6)-RRE*-RNAs ist - mit oder ohne Kotransfektion mit pcRev - stets mit der Transporteffizienz der *syngag-RRE*-RNA vergleichbar (unter Berücksichtigung der Bandenstärke für die Neomycin-Kontrolle). Dagegen war die nukleäre *ch1-2-RRE*-RNA und ihr Export erst nach Kotransfektion mit pcRev detektierbar. Ohne Kotransfektion mit pcRev konnte die RRE-haltige RNA aus mit *ch1-2-RRE* transfizierten Zellen nur sehr schwach nachgewiesen werden. Die spezifische *gag*-RNA konnte aus mit *ch1-3-RRE* und *wtgag-RRE* transfizierten Zellen selbst nach Kotransfektion mit pcRev nie detektiert werden. Dies ist im Widerspruch zu der Auswertung des p24-ELISAs, der nach Transfektion mit diesen Konstrukten immerhin eine sehr geringe Pr55<sup>gag</sup>-Expression zeigte. Da aber die Northern Blot-Analyse nicht so empfindlich ist wie der p24 *Capture Assay*-ELISA, kann man sagen, dass die RNA-Studie die Ergebnisse der Protein-Analyse widerspiegelt.

Ferner konnte in diesem Northern Blot keine zweite RRE-spezifische Bande nach Transfektion mit *ch1-2-RRE* detektiert werden wie etwa bei mit *UTR-ch1-2-RRE* transfizierten Zellen. Erst nach Kotransfektion mit pcRev konnte diese Bande hier nachgewiesen werden, dann allerdings in selber Stärke auch bei mit *ch1-3-RRE* transfizierten Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben dem Einfluss der Sequenz die HI-virale Expression auch über ein Zusammenspiel von Rev mit dem Spleißapparat reguliert wird.

#### **D.2.4. Zusammenfassung**

In diesem Teilabschnitt der Doktorarbeit wurden chimäre *gag*-Konstrukte hergestellt, um den Einfluss der Sequenz auf die Rev-abhängige Gag-Expression austesten zu können. Dabei wurden 20 verschiedene *gag*-Plasmide hergestellt, die in unterschiedlicher Weise einer Chimärisierung mit Wildtyp-spezifischen und kodonadaptierten Fragment-Sequenzen unterzogen wurden.

Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ursache für die unterschiedliche Gag-Expression nach Transfektion mit *wtgag* und *syngag* (niedrigste, hohe Expression - Rev-abhängige, Rev-unabhängige Expression) in einem additiven „inhibitorischen“ Sequenzeffekt liegt. Weitere Expressionsdaten (mit einer eingegrenzten Anzahl an chimären Konstrukten) zeigen weiter, dass dieser Effekt nicht auf die Verwendung verschiedener Primaten-Zelllinien zurückzuführen ist. Deshalb sind in nachfolgender Tabelle nur die Ergebnisse der Pr55<sup>gag</sup>-Expression bzw. die zelluläre RNA-Verteilung nach Transfektion mit *ch1-2*, *ch1-3*, *ch3* und *ch4-6* unter dem Einfluss *cis*- und *trans*-aktiver Elemente aus H1299-Zellen angegeben. Als Vergleichswerte sind zusätzlich die Werte der mit *wtgag* (Negativkontrolle) und *syngag* (Positivkontrolle) transfizierten Zellen schematisch angezeigt.

Lediglich die Plasmide *UTR-ch1-2-RRE* und *UTR-ch1-3-RRE* zeigen ein eindeutiges Rev-abhängiges Verhalten in ihrer Gag-Expression. Ohne *cis*- und *trans*-aktive Elemente ist die Gag-Expression nach Transfektion mit *ch1-3* sehr gering, nach Transfektion mit *ch1-2* allerdings annähernd vergleichbar mit der mit *syngag* transfizierten Zellen. Da aber der einzige Unterschied beider transfizierter Konstrukte in der Sequenzwahl ihres dritten Fragmentes liegt, kann schon hier davon ausgegangen werden, dass die Rev-abhängige *gag*-Expression auf einen additiven Effekt zurückzuführen ist. Desweiteren kann nur bei der Transfektion mit *UTR-ch1-2-RRE* und *UTR-ch1-3-RRE* eine Hemmung der Gag-

Expression aufgrund Inhibition des Exportes der RNA durch Kotransfektion mit pcRevM10 erreicht werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass beide RNAs den gleichen Kerntransportweg wie die *wtgag*-RNA benutzen. Die RNA-Verteilung und -Stabilität kann ebenso mit der *UTR-wtgag-RRE*-RNA verglichen werden. Die Ergebnisse nach Transfektion mit *chl-2-RRE* zeigen, dass Rev unabhängig von der Anwesenheit des UTR-Elementes eine Steigerung der Gag-Expression vermitteln kann. Mit *chl-3-RRE* transfizierten Zellen allerdings ist diese Wirkung nicht zu beobachten. Die Expression dieses Konstruktes reagiert mit und ohne *trans*-aktives Element in gleicher Weise wie die des *wtgag-RRE*-Plasmides. Daraus kann geschlossen werden, dass die Rev-abhängige Expression von *wtgag* in einem additiven „inhibitorischen“ Effekt innerhalb der 5'-Hälfte der Sequenz begründet liegt. Es konnte gezeigt werden, dass die RNA der chimären Konstrukte, die *gag* Rev-abhängig exprimieren, wie das Wildtyp-Plasmid, den Crm-1 Transportweg benutzen, da der RNA-Export mit RevM10 inhibiert werden kann. Die unterschiedliche Stabilität der RNA der chimären Konstrukte begründet sich dabei nicht auf den zugrundeliegenden A/U-Gehalt.

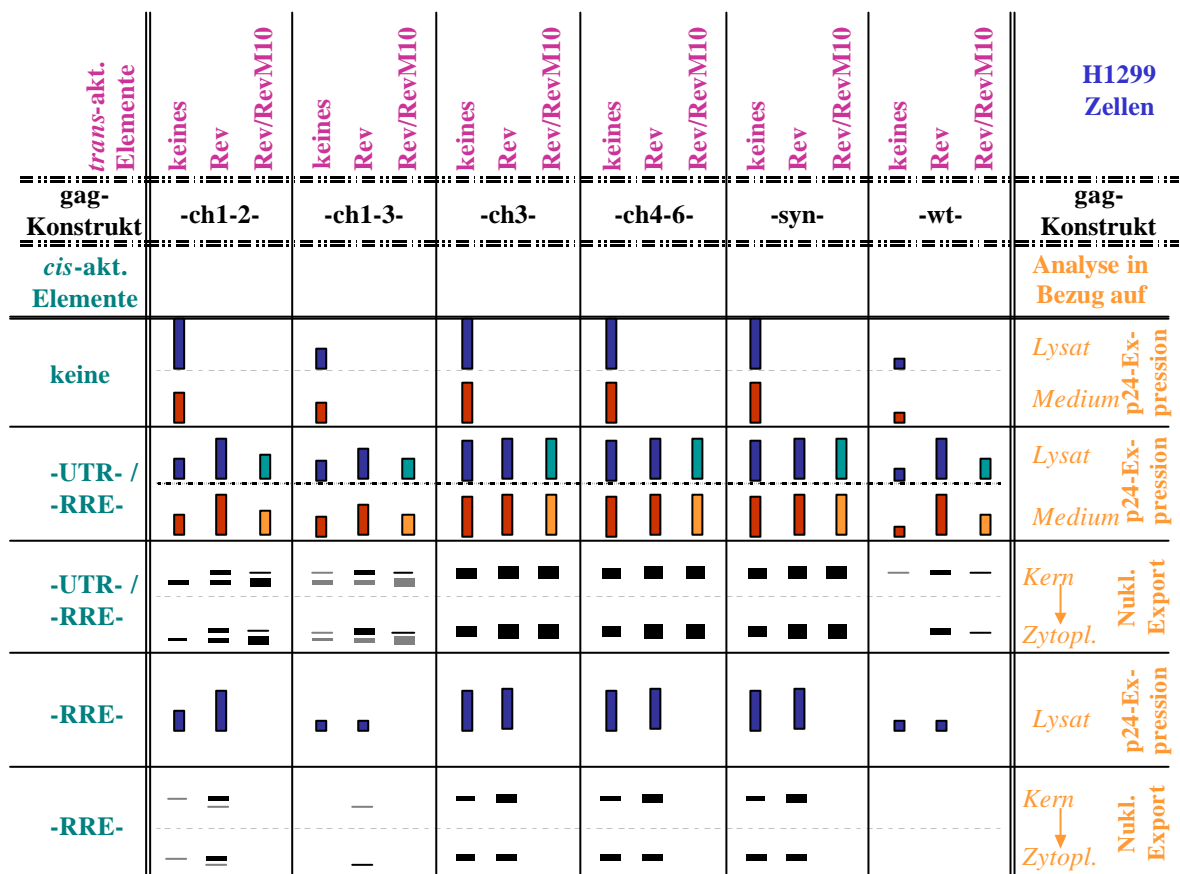


Abbildung D.-14. Schematische Gesamtdarstellung der Ergebnisse von mit *chl-2*, *chl-3*, *chl-3* und *chl-4-6* transfizierten Zellen im Vergleich zu den Resultaten nach Transfektion mit *syn*- und *wtgag* unter dem Einfluss cis- und trans-aktiver Elemente. Die Tendenzen der Resultate der Gag-Expression (Zellysat / Kulturüberstand) sind in Form von Balkendiagrammen („schlechte“, „gute“, „sehr gute“ Expression) wiedergegeben, die vom Northern Blot (nukleäre / zytoplasmatische Fraktion) als Bandenschema. Die Ergebnisse der Pr55<sup>gag</sup>-Expression nach Transfektion mit UTR-syngag-RRE und UTR-wtgag-RRE stammen aus der Doktorarbeit von M. Graf, RIMMH, 2000. Zytopl. = Zytoplasma.

### **D.3. Teilkonzept II: Bedeutung der „kryptischen“, internen Spleißdonoren und des Kodongebrauchs für die Gen-expression im Rahmen von HI-viralen GFP-Konstrukten**

*Hintergrund:* Um zu bestätigen, dass sowohl der 5'-Hauptspleißdonor als auch der hohe A/U-Gehalt der Transkripte die minimalen Voraussetzungen für die Kernretention und die Rev-abhängige Expression von HIV darstellen, wurden in der vorausgegangenen Diplomarbeit von Sylvia Kehlenbeck („Grundlegende Untersuchungen zum Kernexport ungespleißter AT-reicher RNA-Spezies durch Generierung quasientiviraler Genkonstrukte“, 2000) weitere Reporterkonstrukte entworfen. Dafür wurden GFP(*green fluorescent protein*)-Gene herangezogen, welche in ihrem Kodongebrauch an den des HIV-1 Genoms (*hivGFP*) bzw. des humanen Genoms (*huGFP*) angepaßt wurden, ohne einen Unterschied in der daraus resultierenden Aminosäuresequenz aufzuweisen. *HivGFP* und *huGFP* unterscheiden sich damit nur in den kodierenden Nukleinsäuresequenzen, die eine Homologie von 67,917% zueinander hat. In Transfektionsstudien erwies sich die *hivGFP*-RNA in Anwesenheit des 5'-SD als im Zellkern stabil und konnte nach Bereitstellung des Rev/RRE-Systems auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die *huGFP*-Reporterkonstrukte wurden dagegen unabhängig von dem Vorhandensein eines 5'-SD oder des Rev/RRE-Systems exprimiert. Damit konnte bestätigt werden, dass zur Rev-abhängigen Expression eine A/U-reiche, HIV-1-adaptierte Kodonwahl, ein funktioneller 5'-Hauptspleißdonor und eine 3'-gelegene RRE-Sequenz notwendig sind.

#### **D.3.1. Herstellung und Expression der *hivGFP*-Konstrukte mit deletierten Spleißdonorstellen (*DsdGFP*) und nukleärer Export der *DsdGFP*-RNA**

##### **D.3.1.1. Herstellung der *DsdGFP*- und UTR-*DsdGFP*-RRE-Konstrukte**

Ausgehend von *hivGFP* wurde ein Gen entworfen, indem - so weit wie möglich - sowohl alle internen „konsensus“, als auch „kryptischen“ Spleißdonoren mutiert wurden (*DsdGFP*). Die SD-Sequenz besteht üblicherweise aus neun Nukleotiden. Ein „kryptischer“ Spleißdonor zeichnet sich dadurch aus, dass lediglich fünf der neun Positionen mit der „konsensus“ SD-Sequenz übereinstimmen müssen, um als Spleißstelle von den Spleißfaktoren erkannt zu werden. Die Konstruktion von *DsdGFP* erfolgte in der Art, dass die SD-Sequenzmotive in *hivGFP* unter Berücksichtigung der Aminosäuresequenz und eines möglichst hohen A/U-Gehaltes durch Austausch von Nukleinsäuren zerstört wurden. Nach mehrmaligem Überprüfen mit einer selbstgeschriebenen Datei (anhand des HUSAR-Programmes), die alle bisher bekannten möglichen Spleißdonorsequenzen enthielt, wurde die so entworfene Sequenz durch die Firma GENEART (Regensburg) synthetisch hergestellt. Das Konstrukt *DsdGFP* besitzt einen A/U-Gehalt von ca. 66% (Der A/U-Gehalt von *hivGFP* beträgt ca. 69%). Ein Vergleich der Nukleinsäuresequenz zwischen *DsdGFP* und *hivGFP* weisen eine Homologie von 90,556% auf.

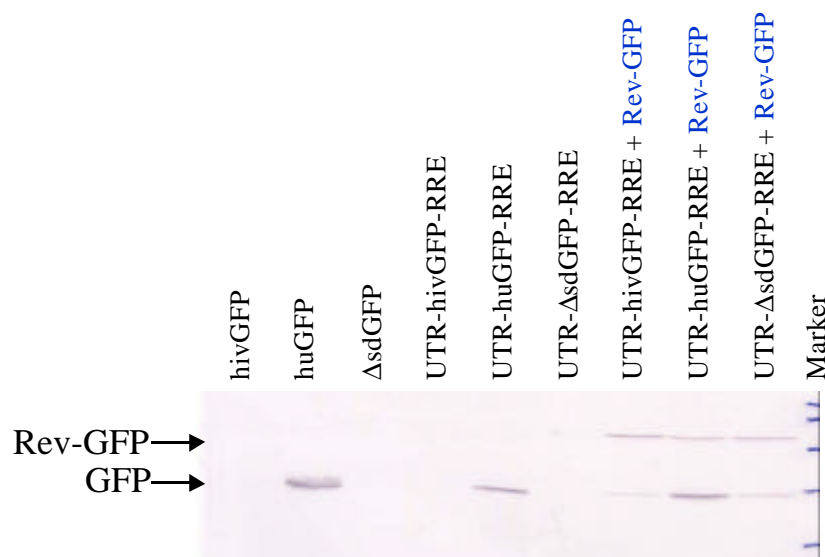
GENEART ligierte *DsdGFP* in den pCR-Script<sup>TM</sup>SK(+)-Vektor (*pCR-Script-DsdGFP*), wobei das GFP-Gen von bestimmten Schnittstellen flankiert wurde, welche weitere Klonierungen ermöglichten: am 5'-Ende von *Kpn* I, *Eco* RI und *Nco* I und am 3'-Ende von *Xho* I und *Sac* I.

*pCR-Script-DsdGFP* wurde mit *Eco* RI und *Xho* I verdaut, um - nach Auftrennung über ein Agarose-Gel und Reinigung über *Qiagen*-Säulchen - über diese Schnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) kloniert werden zu können. Für die Herstellung von *UTR-DsdGFP-RRE* wurde auf das *UTR-hivGFP-RRE*-Konstrukt zurückgegriffen (Die Klonierung ist in einer früheren Arbeit bereits im Detail beschrieben: Kehlenbeck, Diplomarbeit-RIMMH, 2000). Daraus wurde UTR über *Eco* RI und *Nco* I und RRE über *Bam* HI und *Xho* I herausgeschnitten. Das *pCR-Script-DsdGFP* wurde mit *Nco* I und *Bam* HI verdaut und der pcDNA3.1(+)-Vektor über *Eco* RI und *Xho* I geöffnet. Sowohl der Vektor als auch alle drei Inserts (-UTR-, -*DsdGFP*- und -RRE-) wurden nach den jeweiligen präparativen Verdauungen und Auftrennung über ein Agarose-Gel mit anschließender Reinigung über *Qiagen*-Säulchen ligiert. Damit war *DsdGFP* von den zwei wichtigen HI-viralen *cis*-aktiven Elementen (5'-SD und 3'-RRE) im Expressionsvektor flankiert. Alle Klonierungen wurden über Sequenzierungen überprüft (Sequenzierprimer siehe Material).

Im Nachfolgenden werden die pcDNA3.1(+)-(hu-, hiv-, sd-)GFP-Plasmide dem kodierenden Gen entsprechend mit (*hu*-, *hiv*-, *sd*-)GFP abgekürzt. Sind *cis*-aktive Motive (UTR und/oder RRE) an das Gen angefügt, so ist dies durch den Zusatz von UTR und/oder RRE angegeben.

### D.3.1.2. Expression der *DsdGFP*- und *UTR-DsdGFP-RRE*-Konstrukte

Um einen ersten Eindruck zu bekommen, inwieweit die nun deletierten Spleißdonorstellen in *DsdGFP* die Expressionsrate von GFP im Vergleich zu *hivGFP* beeinflussen, wurden die verschiedenen GFP-Konstrukte mit und ohne *cis*- und *trans*-aktiven Elementen (UTR, RRE, Rev) in humane H1299-Zellen transient transfiziert. Als Positivkontrolle diente dabei jeweils das analoge *huGFP*-Konstrukt. Die Zelllysate wurden nach 48 Stunden geerntet und anhand eines GFP-spezifischen Antikörpers im Western Blot analysiert.



**Abbildung D.-15. Western Blot.** Am Vortag der Transfektion wurden H1299 Zellen ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer 6-Well-Platte). Am nächsten Tag wurde mit  $10 \mu\text{g}$  GFP-DNA und  $5 \mu\text{g}$  pcRev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) die Transfektion nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode durchgeführt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Die quantitative Proteinbestimmung des



Zelllysates erfolgte mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Für die SDS-PAGE wurden pro Ansatz 50 µg Gesamtprotein mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, für drei Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 12,5%-SDS-Gel aufgetragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die Detektion des GFP-Proteins erfolgte mit Hilfe eines spezifischen GFP-Antikörpers und anschließender AP-Färbereaktion.

Die Western Blot-Analysen ergaben nach Transfektion mit allen drei *huGFP*-Konstrukte die stärkste Expression und zwar unabhängig von *cis*- und *trans*-aktiven Elementen. Aus mit *hivGFP* und **DsdGFP** transfizierten Zellen kann erst nach Anfügen der *cis*-aktiven Elemente und nach Kotransfektion mit pcRev eine geringe GFP-Expression nachgewiesen werden. Das verwendete Rev-Plasmid ist hierbei an GFP fusioniert, insofern weist der GFP-Antikörper im Western Blot auch das an Rev-gekoppelte GFP-Protein nach. Dies kann zum Nachweis dafür genutzt werden, dafür dass die Kotransfektion bei den einzelnen Konstrukten jeweils mit gleicher Effizienz stattgefunden hat. Sylvia Kehlenbeck konnte in ihrer Diplomarbeit („Grundlegende Untersuchungen zum Kernexport ungespleißter AT-reicher RNA-Spezies durch Generierung quasientiviraler Genkonstrukte“ 2000) anhand eines gekoppelten *in vitro*-Transkriptions- und Translationstestes bereits zeigen, dass die Unterschiede in der GFP-Expression zwischen *huGFP*- und *hivGFP*-transfizierten Zellen nicht auf eine unterschiedliche Translationseffizienz zurückzuführen sind. Mit **DsdGFP** transfizierte Zellen zeigen dieselbe Expression wie mit *hivGFP* transfizierte Zellen. Insofern kann gesagt werden, dass die „kryptischen“ Spleißdonoren nicht für die HIV-typische Expressionsabhängigkeit (Notwendigkeit der Anwesenheit der *cis*- und *trans*-aktiven Elemente) von *hivGFP* verantwortlich sind, da sonst die Expression dieses Konstrukt von diesem Regulationssystem entkoppelt sein müßte.

### **D.3.1.3. Einfluss von Rev auf den nukleären Export der UTR-DsdGFP-RRE-RNA**

Um nun Aussagen darüber treffen zu können, welchen Unterschied mit den GFP-Konstrukten transfizierte Zellen in ihrer zellulären RNA-Verteilung und der RNA-Stabilität haben, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. Dieser Test eignet sich besonders, um die Expression auf der Ebene der Transkription quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Hierfür wurden H1299-Zellen transient mit *UTR-GFP-RRE* transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion separiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Northern Blot anhand der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten ERR-Sonde, die zur RRE-Sequenz komplementär ist. Um die Transfektionseffizienz vergleichen zu können, wurde die RNA in einem weiteren Auftrag mit einer Sonde hybridisiert, die spezifisch an die Neomycin-RNA bindet. Dieses Gen liegt auf dem pcDNA3.1(+)-Vektor. Somit liegt die Neomycin-RNA nur in Zellen vor, die erfolgreich transfiziert wurden.

**Abbildung D.-16. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von UTR-GFP-RRE mit pcRev.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale). Am nächsten Tag wurde mit 30 µg UTR-GFP-RRE Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode transfiziert sowie zusätzlich mit 15 µg pcRev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Der Northern Blot wurde wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

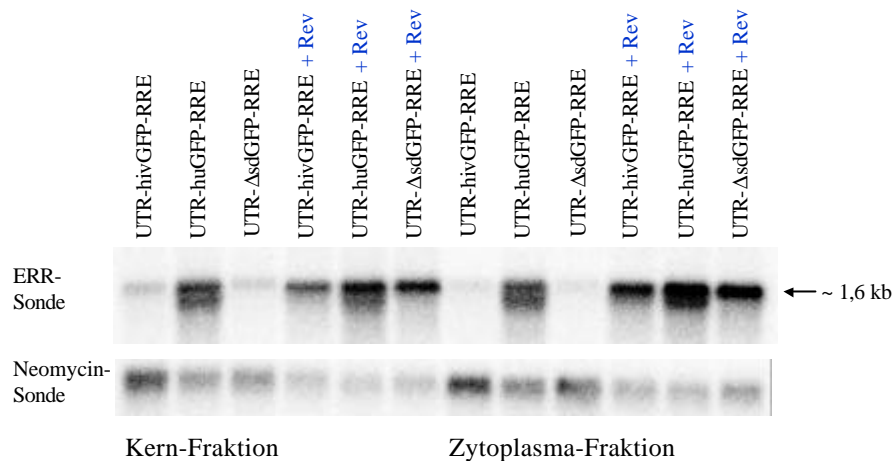


Abbildung D.-16.

Die RNAs von mit *UTR-hivGFP-RRE* und *UTR-ΔsdGFP-RRE* transfizierten Zellen lassen sich ohne Kotransfektion mit pcRev nur minimalst im Kern detektieren. Erst nach Kotransfektion mit pcRev sind die RNAs deutlich im Kern und im Zytoplasma nachzuweisen. Die Bandenstärke dieser RNA ist dabei etwa um ein Drittel schwächer als die *gfp*-RNA aus mit *UTR-huGFP-RRE* transfizierten Zellen. Die Konzentration der RNA nach Transfektion mit *UTR-huGFP-RRE* ist - unabhängig von der Kotransfektion mit pcRev - jeweils im Kern und Zytoplasma gleich. Berücksichtigt man die Bandenstärke der Neomycinsonde bei der Kernfraktion, so kann gesagt werden, dass die RNA von *UTR-ΔsdGFP-RRE* eine leicht verbesserte Stabilität gegenüber der *hivGFP*-RNA hat. Vergleicht man dann die RNA-Enthalpien der GFP-Konstrukte untereinander und setzt die von *huGFP* auf 100% (-69,6 kkal/mol), so hat *hivGFP* eine auf 26,01% (-18,10 kkal/mol) und *ΔsdGFP* eine auf 40,66% (-28,30 kkal/mol) reduzierte Enthalpie [Abbildung unter D.3.3.3.]. Berücksichtigt man ferner den A/U-Gehalt der Konstrukte (*huGFP*: ca. 40%, *hivGFP*: ca. 69%, *ΔsdGFP*: ca. 66%), so kann daraus geschlossen werden, dass die im Northern Blot nachgewiesene unterschiedliche RNA-Stabilität der GFP-Konstrukte auf die zugrundeliegende Enthalpie der RNA zurückzuführen ist, diese sich wiederum aber nicht aus dem A/U-Gehalt der GFP-Plasmide erklärt.

### D.3.2. Herstellung und Expression der GFP-Konstrukte mit verändertem A/U-Gehalt (e-/ *cu*-GFP) und nukleärer Export der (e-, *cu*-)GFP-RNA

#### D.3.2.1. Herstellung der GFP-Konstrukte mit verändertem A/U-Gehalt

Wiederum ausgehend von *hivGFP* sollten Konstrukte entworfen werden, die einen stufenweise steigenden G/C-Gehalt in ihrer GFP-Nukleinsäuresequenz aufweisen - ohne allerdings hierbei Rücksicht auf den HI-viralen Kodongebrauch zu nehmen. Die Konstruktion und Produktion erfolgte hier durch die Firma GENEART (Regensburg). Die drei hergestellten GFP-Plasmide erhielten die Bezeichnungen E1, E2 und E3. *e1GFP* besitzt einen G/C-Gehalt von ca. 45%, *e2GFP* von ca. 50% und *e3GFP* von ca. 55%. Damit hatten wir Konstrukte in den Händen, die den G/C-Prozentbereich zwischen *hivGFP* (ca. 31% GC) und *huGFP* (ca. 60% GC) abdeckten. Die Nukleinsäuresequenzen von *e(1-3)GFP* und *hivGFP* weisen folgende Homologien auf: *e1GFP*: 75%; *e2GFP*: 74,722% und *e3GFP*: 72,5%.

Ausgehend von *huGFP* sollte zudem ein Konstrukt hergestellt werden, dass - unter Berücksichtigung des humanen Kodongebrauchs - den G/C-Gehalt soweit wie möglich vermindert hat. Die Konstruktion und Produktion erfolgte hier ebenfalls durch die Firma GENEART (Regensburg). Das angefertigte Plasmid erhielt den Namen *cuGFP* (wegen Berücksichtigung der *codon usage*) und weist einen G/C-Gehalt von nunmehr ca. 53% auf. Der Nukleinsäuresequenzvergleich zwischen *cuGFP* und *huGFP* zeigt eine Homologie von 86,389% auf, der von *cuGFP* mit *hivGFP* 70,694%.

Die Klonierung von *e(1-3)GFP* und *cuGFP* durch GENEART erfolgte mit derselben Strategie wie bei *pCR-Script-DΔGFP* (siehe D.3.1.1.). Die Ligation in den pcDNA3.(+)-Expressionsvektor und das Anfügen der HI-viralen *cis*-aktiven Elemente (5'-SD und 3'-RRE) wurde anhand denselben Ausgangskonstrukten und Schnittstellen vorgenommen wie zuvor bei *DΔGFP* (siehe ebenfalls D.3.1.1.).

Alle Klonierungen wurden über Sequenzierungen überprüft (Sequenzierprimer siehe Material).

In Nachfolgenden werden die pcDNA3.1(+)-(e(1, 2, 3)-, *cu*-)GFP-Plasmide dem kodierenden Gen entsprechend mit *e(1, 2, 3)-*, *cu*-)GFP abgekürzt. Sind *cis*-aktive Motive (UTR und/oder RRE) and das Gen angefügt, so ist dies durch den Zusatz von UTR und/oder RRE angegeben.

#### **D.3.2.2. Expression der GFP-Konstrukte mit verändertem A/U-Gehalt**

Um auszutesten, inwieweit der A/U-Gehalt von *gfp* ohne Berücksichtigung der Kodonwahl die Expressionsrate des *hivGFP*-Konstruktes beeinflusst, wurden die verschiedenen GFP-Konstrukte mit und ohne *cis*- und *trans*-aktiver Elemente (UTR, RRE, Rev) in humane H1299-Zellen transient transfiziert. Als Positiv-Kontrolle diente dabei jeweils das analoge *huGFP*-Konstrukt. Die Zelllysate wurden nach 48 Stunden geerntet. Da die Sensitivität des Western Blots zu gering war, um Expressionsunterschiede zwischen den *e(1-3)GFP*-Konstrukten aufzudecken, wurde der GFP-Gehalt im Zelllysate über die Vermessung der GFP-Fluoreszenz mit dem Fluorimeter bestimmt. Die Austestung mit dem Fluorimeter ist eine einfache und schnelle Methode, um eine quantitative Aussage über den GFP-Gehalt im Zelllysate treffen zu können.

Da im Fluorimeter aber auch die Fluoreszenz des an Rev-gekoppelten GFP-Proteins (nach Transfektion mit pcRev) nachgewiesen worden wäre, wurden hier die Kotransfektionen mit pcwtRev durchgeführt.

**Abbildung D.-17. GFP-Fluoreszenz nach Transfektion mit den jeweiligen GFP-Konstrukten.** 50 µg des GFP-haltigen Zelllysats wurden in PBS (ohne bivalente Ionen) gelöst und bei einem Absorptionsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 509 nm über 30 Sekunden vermessen. Die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates wurde hierbei mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Kotransfektion erfolgte mit einem Rev-Plasmid, das diesmal nicht mit GFP fusioniert war (pcwtRev). Der Mittelwert und die Standardabweichung ergeben sich aus dem für das jeweilige GFP-Konstrukt ermittelten niedrigsten und höchsten Wert (links). Die rechte Darstellung gibt die erreichten Fluorimeterwerte in Bezug auf *huGFP* (=100%) wieder.

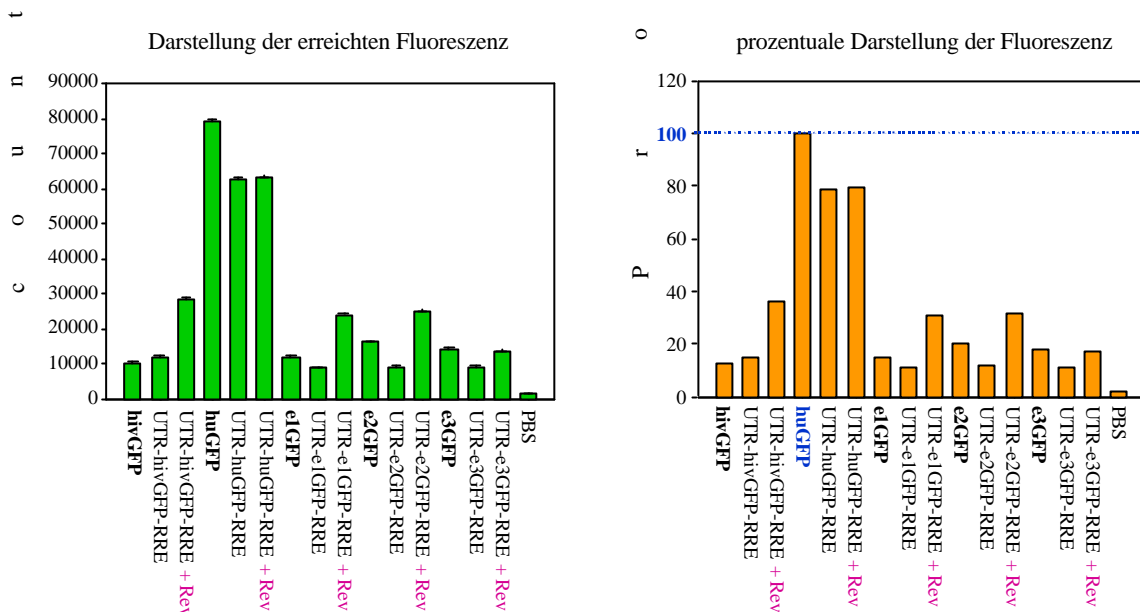
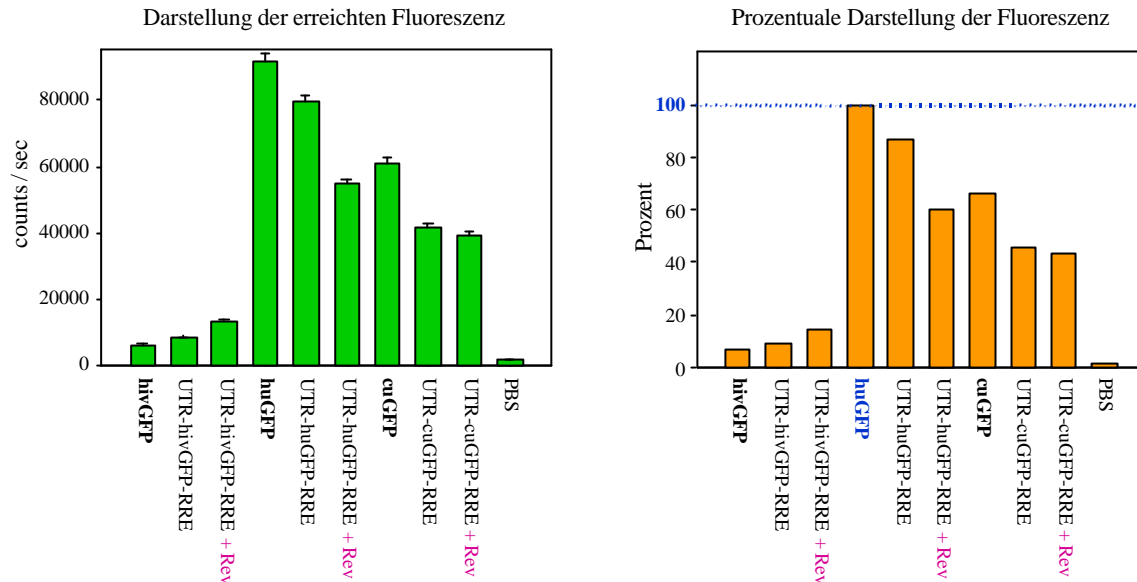


Abbildung D.-17.

Die obige Darstellung zeigt zum einen die tatsächlich erreichten Fluoreszenz-Werte [counts/sec] nach Transfektion mit den einzelnen GFP-Konstrukte (links), zum anderen - um besser vergleichen zu können - deren prozentualen Werte bezogen auf *huGFP*, dessen Fluoreszenz auf 100% gesetzt wurde (rechts). Die GFP-Expression mit *huGFP* transfizierten Zellen war am stärksten, gefolgt von mit *UTR-huGFP-RRE* transfizierten Zellen, und zwar unabhängig von der Kotransfektion mit pcwtRev. Der Rückgang der GFP-Expression nach Transfektion mit *UTR-huGFP-RRE* im Vergleich zu *huGFP* transfizierten Zellen kann dadurch erklärt werden, dass dieses Plasmid nahezu 1 kb (UTR: 105 bp, RRE: 862 bp) größer ist und sich somit nicht mit derselben Effizienz transfizieren lässt wie *huGFP*. *HivGFP*- und *UTR-hivGFP-RRE*-transfizierte Zellen wiesen annähernd gleiche GFP-Expressionen auf. Nach Kotransfektion mit pcwtRev konnte die Expression von mit *UTR-hivGFP-RRE* transfizierte Zellen verdoppelt werden, was dann etwa 40% zur Positivkontrolle (*huGFP*) darstellt. Die erreichten „counts“ nach Transfektion mit den *eGFP*-Konstrukte lagen zwischen 15 und 21%, die der mit *UTR-eGFP-RRE*'s transfizierten Zellen zwischen 11 und 12%. Dieser Wert konnte nach Kotransfektion mit pcwtRev bei mit *UTR-e(1, 2)-RRE* transfizierten Zellen jeweils auf 30% gesteigert werden, bei mit *UTR-e3GFP-RRE* transfizierten Zellen hingegen lediglich auf 17%. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Expression der *eGFP*-Konstrukte wie *hivGFP* einer Rev-Regulation unterliegen, da nur diese Konstrukte nach Anfügen von UTR und RRE eine gesteigerte GFP-Expression nach Kotransfektion mit pcwtRev aufzeigten. Für die Rev-Abhängigkeit der Expression kann hier aber nicht der A/U-Gehalt von *gfp* verantwortlich sein, da sich die *eGFP*-Konstrukte - trotz unterschiedlichem A/U-Gehalt - kaum in ihrer Expression unterscheiden. Bei einem Einfluss des A/U-Gehaltes von *gfp* auf die Expression, hätte man - mit sinkendem A/U-Gehalt der GFP-Konstrukte (von *e1*- über *e2*- zu *e3GFP*) - eine Steigerung der GFP-Expression erwartet. Dies konnte aber nicht nachgewiesen werden.

In einem zweiten Versuch sollte desweiteren nachgewiesen werden, inwieweit der A/U-Gehalt unter Berücksichtigung der Kodonwahl einen Einfluss auf die Expression von

*huGFP* hat. Dazu wurden verschiedene GFP-Konstrukte mit und ohne *cis*- und *trans*-aktiven Elementen (UTR, RRE, Rev) in humane H1299-Zellen transient transfiziert. Die Zelllysate wurden nach 48 Stunden geerntet und wieder mit dem Fluorimeter ausgetestet, da sich auch hier der Western Blot als zu wenig sensitiv erwies.



**Abbildung D.-18. GFP-Fluoreszenz nach Transfektion mit den jeweiligen GFP-Konstrukten.** 50 µg des GFP-haltigen Zelllysats wurden in PBS (ohne bivalente Ionen) gelöst und bei einem Absorptionsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 509 nm über 30 Sekunden vermessen. Die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates wurde hierbei mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Kotransfektion erfolgte mit einem Rev-Plasmid, das diesmal nicht mit GFP fusioniert war (pcwtRev). Der Mittelwert und die Standardabweichung ergeben sich aus dem für das jeweilige GFP-Konstrukt ermittelten niedrigsten und höchsten Wert (links). Die rechte Darstellung gibt die erreichten Fluorimeterwerte in Bezug auf *huGFP* (=100%) wieder.

Die Fluorimeterwerte nach Transfektion mit *hivGFP* und *huGFP* sind hierbei nahezu dieselben wie aus der vorausgegangenen Fluoreszenzmessung. Nur mit *UTR-huGFP-RRE* transfizierte Zellen zeigen nach Kotransfektion mit pcwtRev eine Reduzierung der GFP-Expression um 20%. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Kotransfektion mit pcwtRev nicht so effizient war wie bei den anderen Konstrukten (Analyse des Western Blots; nicht gezeigt). Die GFP-Expression nach Transfektion mit *cuGFP* erreicht etwa 67% des Wertes von mit *huGFP* transfizierte Zellen. *UTR-cuGFP-RRE*-transfizierte Zellen kommen Rev-unabhängig auf etwa 44% zur Positivkontrolle. Dieser Expressionsunterschied konnte zuvor schon bei dem *huGFP*-Konstrukt beobachtet werden. Insofern liegt auch hier der Schluß nahe, dass das *UTR-cuGFP-RRE*-Konstrukt aufgrund seiner Größe insgesamt eine schlechtere Transfektionseffizienz aufweist als das um etwa 1 kb kleinere *cuGFP*-Konstrukt. Vergleicht man weiter die prozentualen Fluoreszenzwerte in den Zelllysaten nach Transfektion mit *e3GFP* (A/U: 45%) und *cuGFP* (A/U: 47%), so zeigt sich ein dramatischer Unterschied in der jeweils erreichten GFP-Expression. Für *e3GFP*-transfizierte Zellen lagen sie ohne bzw. mit *cis*- (UTR, RRE) und zuletzt auch *trans*-aktiven (Rev) Elementen bei 18, 11 und 17%, für *cuGFP*-transfizierte Zellen dagegen bei 67, 45 und 43% - jeweils in Bezug auf die Werte nach Transfektion mit *huGFP*.

Daraus wird ersichtlich, dass die dem *cuGFP*-Konstrukt zugrundeliegende humane Kodon-„Usage“ - trotz nahezu gleichem A/U-Gehalt wie *e3GFP* - für die Rev-Unabhängigkeit der Expression von *UTR-cuGFP-RRE* verantwortlich ist. Die schlechtere GFP-Expression von mit *cuGFP* transfizierten Zellen gegenüber *huGFP*-transfizierten Zellen ist darin zu begründen, dass durch eine gewollte Senkung des G/C-Gehaltes bei der Herstellung des Konstruktes trotzdem nicht der absolut optimale humane Kodongebrauch verwendet werden konnte.

#### **D.3.2.3. Einfluss von Rev auf den nukleären Export der GFP-RNA mit verändertem A/U-Gehalt**

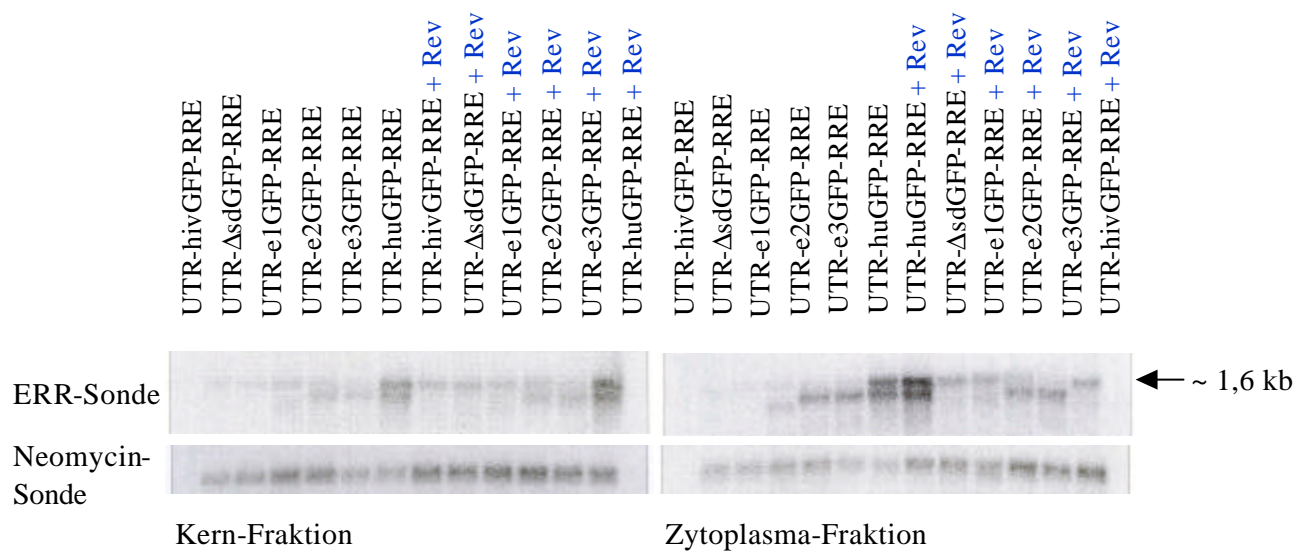
Um austesten zu können, welche RNA-Verteilung bei mit den GFP-Konstrukten (mit verändertem A/U-Gehalt) transfizierten Zellen vorhanden ist und welche Stabilität die nach Transfektion gebildete RNAs haben, wurden wiederum Northern Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden H1299-Zellen transient mit *UTR-GFP-RRE* transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion separiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Northern Blot wie bereits zuvor (D.3.1.3.) erläutert.

**Abbildung D.-19. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von *UTR-GFP-RRE* mit *pcRev* bzw. leerem Vektor [Abbildung siehe Extra-Blatt – Seite 69a].**

Bei diesem Northern Blot diente neben *UTR-hivGFP-RRE*- und *UTR-huGFP-RRE*-transfizierte Zellen zusätzlich *UTR-DdGFP-RRE*-transfizierte Zellen als Vergleichsbasis. Die Ergebnisse für die RNAs aus diesen Transfektionen waren hierbei dieselben wie in dem vorausgegangenen Northern Blot.

Im Kern lagen alle *UTR-eGFP-RRE*-RNAs etwa gleich stark vor. Im Vergleich dazu schwächer war die *gfp*-RNA-Bande nach Transfektion mit *UTR-DdGFP-RRE*. Nach Kotransfektion mit *pcRev* konnte im Kern nur bei der *UTR-hivGFP-RRE*- und *UTR-DdGFP-RRE*-RNA ein deutlicher RNA-Stabilisierungseffekt von Rev beobachtet werden. Im Zytoplasma konnte die spezifische *gfp*-RNA ohne Kotransfektion mit *pcRev* nur bei mit *UTR-huGFP-RRE* transfizierten Zellen in nennenswerten Ausmaß nachgewiesen werden. Nach Kotransfektion mit *pcRev* konnte sie dann aus allen GFP-transfizierten Zellen identifiziert werden. Desweiteren konnte nach Transfektion mit *UTR-huGFP-RRE*, *UTR-e2GFP-RRE* und *UTR-e3GFP-RRE* auch eine etwas tiefer laufende zweite RNA-Bande detektiert werden. Da der RNA-Nachweis über das RR-Element erfolgt, muß hier von einer spezifischen *gfp*-Bande ausgegangen werden. Diese RNA-Bande liegt bei diesen drei Transfektionen im Kern und im Zytoplasma vor und wird Rev-unabhängig exportiert. Insgesamt spiegeln die Northern Blot-Daten somit die Ergebnisse aus dem Fluorimeter wieder.

Vergleicht man die RNA-Enthalpien der GFP-Konstrukte untereinander und setzt die von *huGFP* auf 100% (-69,60 kkal/mol), so weisen *hivGFP* 26,01% (-18,10 kkal/mol), *DdGFP* 40,66% (-28,30 kkal/mol), *e1GFP* 85,92% (-59,8 kkal/mol), *e2GFP* 86,06% (-59,9 kkal/mol) und *e3GFP* 92,24% (-64,2 kkal/mol) auf [Abbildung unter D.3.3.3.].



**Abbildung D.-19. Northern Blot Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von UTR-GFP-RRE mit pcRev bzw. leerem Vektor.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale). Am nächsten Tag wurde mit  $30 \mu\text{g}$  UTR-GFP-RRE Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode transfiziert sowie zusätzlich mit  $15 \mu\text{g}$  pcRev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Der Northern Blot wurde wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt.

Berücksichtigt man ferner den A/U-Gehalt der Konstrukte (*huGFP*: ca. 40%, *hivGFP*: ca. 69%, *DdGFP*: ca. 66%, *e1GFP*: ca. 55%, *e2GFP*: ca. 50%, *e3GFP*: ca. 45%), so kann daraus geschlossen werden, dass die im Northern Blot nachgewiesene unterschiedliche RNA-Stabilität der GFP-Konstrukte auf die zugrundeliegende Enthalpie der RNA zurückzuführen ist, diese sich wiederum aber nicht aus dem A/U-Gehalt der GFP-Plasmide erklärt.

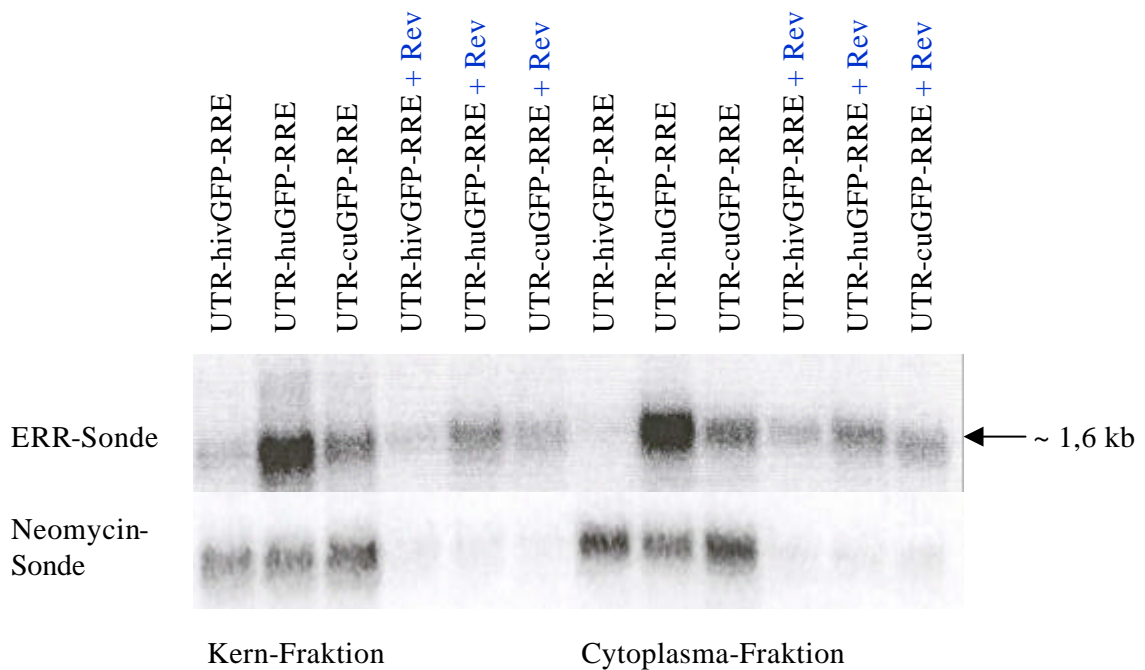
In einem letzten Northern Blot wurde schließlich noch betrachtet, welche RNA-Verteilung bei mit *cuGFP* transfizierten Zellen vorhanden ist und welche Stabilität die nach dieser Transfektion gebildeten RNAs haben. Hierfür wurden H1299-Zellen transient mit *UTR-(cu/hiv/hu)GFP-RRE* transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion separiert. Anschließend erfolgte die Auswertung im Northern Blot wie bereits zuvor (D.3.1.3.) erläutert.

**Abbildung D.-20. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fractionen nach Kotransfektion von UTR-GFP-RRE mit pcRev bzw. leerem Vektor [Abbildung siehe Extra-Blatt – Seite 70a].**

Als Vergleichsbasis dienten hierbei mit *UTR-hivGFP-RRE* und *UTR-huGFP-RRE* transfizierte Zellen. Wie aus der Abbildung D.-20. zu erkennen ist, weist die Stärke der Neomycin-Sonde Unterschiede auf, die man bei der Auswertung berücksichtigen muss. Diese ist wahrscheinlich auf das Einrollen des Blots während der Inkubationszeit und des Waschens zurückzuführen. Dabei sind jeweils die Kotransfektionen mit pcRev gleichermaßen deutlich schwächer, was dann wiederum einen direkten visuellen Vergleich der Ergebnisse untereinander ermöglicht. Ohne Kotransfektion mit pcRev kann die *UTR-hivGFP-RRE*-RNA im Zytoplasma nicht und im Kern nur schwach nachgewiesen werden. Die *UTR-cuGFP-RRE*-RNA dagegen lässt sich wie die *UTR-huGFP-RRE*-RNA Rev-unabhängig im Kern und Zytoplasma nachweisen, wobei die Bande der *UTR-huGFP-RRE*-RNA jeweils etwa um ein Drittel stärker ist. Diese Daten sind damit im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Fluorimeter.

Vergleicht man hier die RNA-Enthalpien der GFP-Konstrukte untereinander und setzt die von *huGFP* auf 100% (-69,6 kkal/mol), so hat, wie bereits erwähnt, *hivGFP* einen Wert von 26,01% (-18,10 kkal/mol) und *cuGFP* einen Wert von 106,9% (-74,4 kkal/mol). Die Konstruktion von *cuGFP* (G/C: ca. 53%) basierte darauf, dass der G/C-Gehalt von *huGFP* (G/C: ca. 60%) soweit wie möglich gesenkt wird, ohne aber die humane Kodon-„Usage“ zu beeinflussen. Die daraus resultierende *cuGFP*-RNA zeigt einen höheren Enthalpiewert als das ihm zugrunde liegende *huGFP*-Konstrukt. Dennoch ist ihre GFP-Expression (Fluorimeter) und RNA-Stabilität (Northern Blot) geringer als die des Ausgangskonstruktes. Man kann vermuten, dass der humane Kodongebrauch für die nukleäre RNA-Prozessierung ein in sich optimales System ist, und es insofern unmöglich ist, Änderungen innerhalb der Nukleinsäuresequenz vorzunehmen, die dieses System (RNA-Stabilität, Transkription, etc.) in keiner Weise beeinflussen. Der größere A/U-Gehalt des *cuGFP*-Konstruktes kann nicht für die im Vergleich zu mit *huGFP* transfizierten Zellen geringere Expression verantwortlich sein, da die dem Konstrukt zugrundeliegende RNA - aufgrund höherer Enthalpiewerte - stabiler sein müsste als die von *huGFP*.

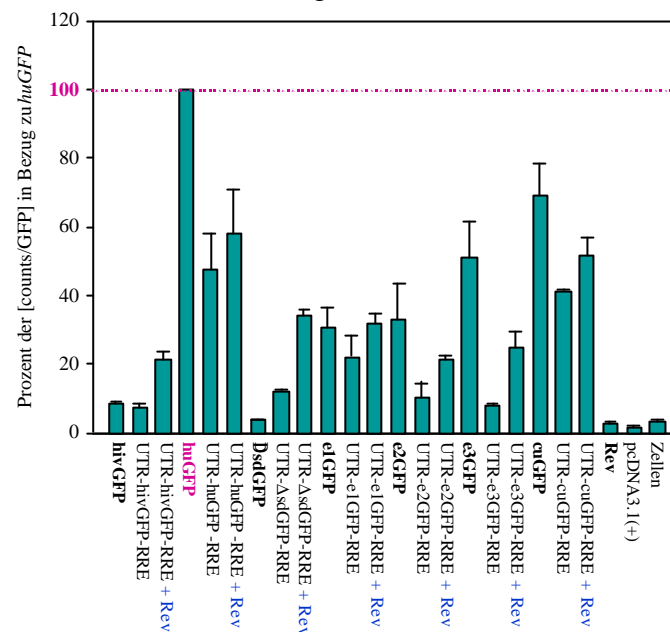




**Abbildung D.-20. Northern Blot Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Kotransfektion von UTR-GFP-RRE mit pcRev bzw. leerem Vektor.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale). Am nächsten Tag wurde mit  $30 \mu\text{g}$  UTR-GFP-RRE Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode transfiziert sowie zusätzlich mit  $15 \mu\text{g}$  pcRev oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)) kotransfiziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert. Der Northern Blot wurde wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils  $5 \mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt.

### D.3.3. Vergleichende Studien mit den kodonmodifizierten GFP-Konstrukten

In einer letzten Studie wurden die mit den GFP-Konstrukten transfizierten Zellen einer FACS-Analyse unterworfen. Die Durchflußzytometrie (*fluoreszenz activating cell sorting*, FACS) stellt eine weitere Methode zur Quantifizierung der GFP-Fluoreszenz dar. Bei dieser Messung werden die lebenden transfizierten Zellen einzeln vermessen. Es ist dabei möglich, die Intensität der Fluoreszenzstrahlung jeder einzelnen Zelle zu bestimmen. Hierfür wurden H1299-Zellen transient mit den jeweiligen GFP-Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden durch vorsichtiges Abtrypsinieren geerntet. Die FACS-Analyse wurde jeweils mit etwa 20 000 Zellen durchgeführt.



**Abbildung D.-21. FACS-Analyse nach Transfektion mit den GFP-Konstrukten.** Die Darstellung zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung von drei unabhängig voneinander durchgeführten FACS-Analysen. Dafür wurden H1299- Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale) transient mit 30  $\mu$ g GF- DNA transfiziert. Die Kotransfektion erfolgte mit 15  $\mu$ g Rev-Plasmid (pcwtRev) oder leerem Vektor (pcDNA3.1(+)). Nach 36 Stunden wurden die Zellen vorsichtig abtrypsiniert und in PBS aufgenommen. Die FACS-Analyse wurde jeweils mit etwa 20 000 Zellen durchgeführt.

Die FACS-Ergebnisse nach Transfektion mit den jeweiligen *hivGFP*- und *huGFP*-Konstrukte sind im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Fluorimeter.

Die Expression von mit *UTR-DsdGFP-RRE* transfizierten Zellen ist nach Kotransfektion mit pcwtRev bei dieser Analyse ungewöhnlich stark. Allerdings ist hier auch die Expression von mit *UTR-DsdGFP-RRE* transfizierten Zellen bereits stärker als mit der Fluorimetrauswertung beobachtet. Auch die mit *eGFP* transfizierte Zellen zeigen höhere Expressionswerte. Verglichen mit den Werten nach Transfektion mit *UTR-DsdGFP-RRE* sind sie im Einklang mit den Ergebnissen aus dem Northern Blot. Der Unterschied der Konstrukte in ihrer GFP-Expression nach Auswertung mit dem FACS bzw. mit dem Fluorimeter kann mit der verschiedenen Sensitivität der Testsysteme begründet werden (FACS sensitiver als Fluorimeter).

Der ungewöhnlich starke Abfall der GFP-Expression nach Transfektion mit *UTR-e2GFP-RRE* und *UTR-e3GFP-RRE* in Vergleich zu *e2GFP*- und *e3GFP*-transfizierte Zellen kann mit der im Northern Blot nachgewiesenen zweiten spezifischen *gfp*-RNA-Bande erklärt werden. Die Konstrukte werden wahrscheinlich gespleißt, weshalb der Nachweis ihrer Expression zurückgeht.

Die GFP-Expression nach Transfektion mit *e3GFP* ist mit der FACS-Analyse überraschenderweise sehr hoch, erreicht aber immerhin nur etwa 50% von dem Expressionswert von mit *huGFP*-transfizierten Zellen, und dies, obwohl die A/U-Differenz beider Konstrukte nur ca. 5% (RNA Enthalpiedifferenz: 5,4 kkal/mol) beträgt.

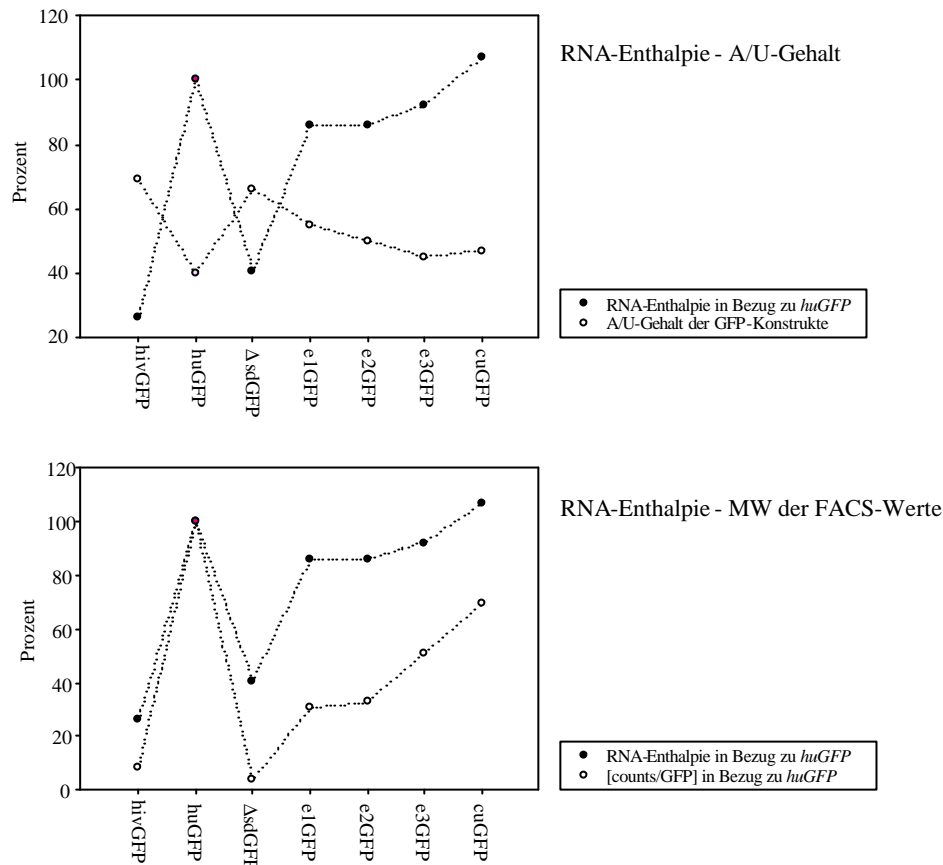
Die Ergebnisse nach Transfektion mit den *cuGFP*-Konstrukten sind ebenfalls im Einklang mit der Fluorimeterauswertung. Ein direkter Vergleich zwischen den *cuGFP*-Konstrukten mit den anderen GFP-Konstrukten zeigt, dass *cuGFP*-transfizierte Zellen zwar eine geringere Expression als mit *huGFP* transfizierte Zellen aufweisen, diese aber dennoch höher liegt als nach Transfektion mit *UTR-huGFP-RRE*. Ebenso weisen die mit *UTR-cuGFP-RRE* transfizierte Zellen jeweils nach den mit *UTR-huGFP-RRE* transfizierten Zellen die beste GFP-Expression auf.

Das Phänomen, dass ein Plasmid mit einer höheren RNA-Enthalpie schlechtere Expressionswerte aufzeigt, wird hier neben dem bereits erwähnten *huGFP*- (-69,6 kkal/mol) und *cuGFP*- (-74,4 kkal/mol) Paar auch zwischen *hivGFP* (-18,1 kkal/mol) und ***DsdGFP*** (-28,3 kkal/mol) deutlich. Die Differenz der Enthalpiewerte liegt dabei sogar über zehn kkal/mol. Die FACS-Analysen transfizierter Zellen sind hier im Einklang mit den jeweiligen Northern Blots bzw. Fluorimeter-Daten. Desweiteren verdeutlicht die FACS-Analyse die Rev-Abhängigkeit der GFP-Expression der Plasmide *UTR-(hiv, Dsd, e2, e3)GFP-RRE*.

Abbildung D.-22. stellt die Ergebnisse der FACS-Analyse in Beziehung zu der RNA-Enthalpie; desweiteren zeigt sie die Gegenüberstellung der Enthalpie zum A/U-Gehalt der Konstrukte.

Diese Darstellung zeigt, dass mit steigendem G/C-Gehalt (= sinkendem A/U-Gehalt) der GFP-Plasmide in der Regel auch die RNA-Enthalpie zunimmt. Abweichend davon reagiert das *huGFP*-Konstrukt. Obwohl es den kleinsten A/U-Gehalt hat, ist die RNA-Enthalpie seiner Sequenz schlechter als die von *cuGFP* (A/U-Differenz: ca. 7%; Enthalpie-Differenz: 4,8 kkal/mol). Dennoch zeigt es die stärkste GFP-Expression. Man kann vermuten, dass die bessere GFP-Expression des *huGFP*-Plasmids auf den in seiner Nukleinsäuresequenz liegenden optimalen Kodongebrauch zurück geht. Desweiteren zeigt sich hier, dass der A/U-Gehalt der GFP-Plasmide nicht direkt mit ihrer RNA-Enthalpie korreliert, sondern nur tendenziell.

Die untere Abbildung bei D.-22. zeigt den direkten Vergleich zwischen der RNA-Enthalpie der GFP-Konstrukte und den jeweils nach Transfektion erreichten FACS-Daten. Hier ist ebenfalls eine allgemeine Tendenz erkennbar: Je höher die RNA-Enthalpie der Plasmide, desto besser auch die GFP-Expression. Ebenso gibt es aber Ausnahmen: Vergleicht man die Konstrukte *hivGFP* mit ***DsdGFP*** bzw. *huGFP* mit *cuGFP*, so zeigen hier jeweils die Konstrukte mit der kleineren Enthalpie (*hivGFP*, *huGFP*) eine stärkere Expression. Auch dies ist ein Beweis dafür, dass die RNA-Enthalpie der Konstrukte zwar von ihrem A/U-Gehalt beeinflusst wird, die Stabilität der RNA und eine erfolgreiche Expression aber von weiteren Faktoren abhängig ist.



**Abbildung D.-22. Vergleich der RNA-Enthalpien, GFP-Expressionsraten (mit FACS bestimmt) und A/U-Gehalt der GFP-Konstrukte.** Die RNA-Enthalpien wurden mit Hilfe der Internetseite <http://www.genebee.msu.su> anhand der dortigen Standardeinstellungen berechnet. Der Wert von *huGFP* wurde dann für die interne Standardisierung auf 100% gesetzt. Im Vergleich dazu sind die jeweils erreichten GFP-Expressionsraten der GFP-Konstrukte aus den FACS-Analysen (unten) angegeben bzw. der A/U-Gehalt der Konstrukte (oben). MW steht für Mittelwert.

### D.3.4. Zusammenfassung

In dem zweiten Teil der Doktorarbeit wurden unterschiedliche GFP-Konstrukte entworfen, um den Einfluss der Spleißdonorstellen bzw. des A/U-Gehaltes der Sequenz auf die GFP-Expression austesten zu können. Grundlegend dafür waren jeweils die bereits hergestellten *hivGFP*- bzw. *huGFP*-Konstrukte. Mit Hilfe der neu konzipierten GFP-Konstrukte sollte der Expressionsunterschied zwischen *hivGFP* und *huGFP* (niedrige, hohe Expression – Rev-abhängige, Rev-unabhängige Expression) ergründet werden.

In Tabelle D.-23. sind die Ergebnisse nach Transfektion mit den GFP-Konstrukten unter dem Einfluss *cis*- und *trans*-aktiver Elemente schematisch wiedergegeben.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die geringe GFP-Expression nach Transfektion mit *hivGFP* gegenüber mit *huGFP* transfizierten Zellen nicht auf den hohen A/U-Gehalt der Sequenz zurückzuführen ist. Wäre der A/U-Gehalt die Ursache dafür, so hätte man nach Transfektion mit (*e1-e3*)GFP einen stufenweisen Anstieg (von *e1*- über *e2*- zu *e3GFP*) der GFP-Expression beobachten müssen. Dies war aber nicht der Fall. Bei der Herstellung von *ΔsdGFP* wurde versucht, - soweit wie möglich - alle „normalen“ und „kryptischen“ Spleißdonoren (SD) innerhalb der *hivGFP*-Sequenz zu zerstören. Das Problem dabei war allerdings, dass sich ein „kryptischer“ SD dadurch auszeichnet, dass lediglich eine

Übereinstimmung von 5/9 Nukleotiden zur normalen Sequenz ausreicht, um als Spleißdonor von den Spleißfaktoren erkannt zu werden. Gleichzeitig sollte der A/U-Gehalt des GFP-Plasmides so gering wie möglich variiert werden. Desweiteren beeinflusst auch die die Spleißstelle umgebende Sequenz, wie gut diese von den Spleißfaktoren erkannt wird. (Im Anhang (F.6.) befindet sich eine Tabelle, die einen Überblick über die Anzahl und Art der Spleißstellen in *huGFP*, *hivGFP* und *DsdGFP* gibt.) Unter der Annahme, dass in *DsdGFP* nahezu alle „kryptischen“ SD's weitestgehend erfolgreich deletiert wurden, kann man sagen, dass auch die SD's nicht für die schlechte Expression von *hivGFP* verantwortlich sein können. Wäre dies der Fall, so hätte *UTR-DsdGFP-RRE* Rev-unabhängig exprimiert werden müssen. Vergleicht man die Ergebnisse der Transfektion mit den Konstrukten (*GFP*, *UTR-GFP-RRE*, *UTR-GFP-RRE* + Rev) von *e3GFP* mit denen von *cuGFP*, so erkennt man wesentliche Unterschiede. *e3GFP*-transfizierte Zellen haben trotz höherem G/C-Gehalt von *e3GFP* eine schlechtere GFP-Expression als *cuGFP*-transfizierte Zellen. Der Grund dafür könnte in der zugrundeliegenden RNA-Enthalpie der GFP-Konstrukte (*e3GFP*: -64,2 kkal/mol; *cuGFP*: -74,4 kkal/mol) liegen. Andererseits ist die GFP-Expression mit *UTR-cuGFP-RRE* transfizierte Zellen Rev-unabhängig, während die mit *UTR-e3GFP-RRE* transfizierte Zellen das HI-virale Regulatorprotein benötigen. Die GFP-Plasmide sind dabei jeweils von einem anderen Ausgangskonstrukt konstruiert worden. *e3GFP* ausgehend von *hivGFP*, indem der G/C-Gehalt der Sequenz - ohne Berücksichtigung der Kodonwahl - erhöht wurde, *cuGFP* dagegen von *huGFP*, indem der G/C-Gehalt - unter Berücksichtigung der humanen Kodon-„Usage“ - gesenkt wurde. Insofern könnte der dramatische Unterschied im Expressionsverhalten beider Plasmide in der jeweils zugrundeliegenden - wenn auch veränderten - Kodonwahl liegen. Die *cuGFP*-Sequenz kommt am nächsten an den Kodongebrauch von *huGFP* heran, deshalb zeigen auch *cuGFP*-transfizierte Zellen - nach *huGFP*-transfizierte Zellen - die beste GFP-Expression.

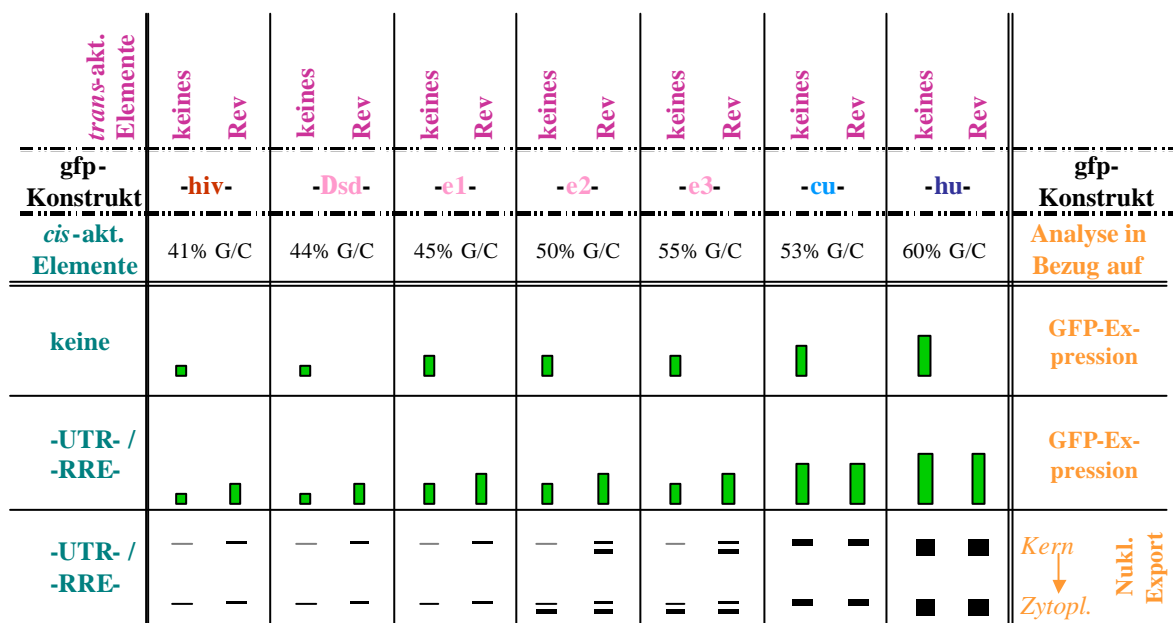


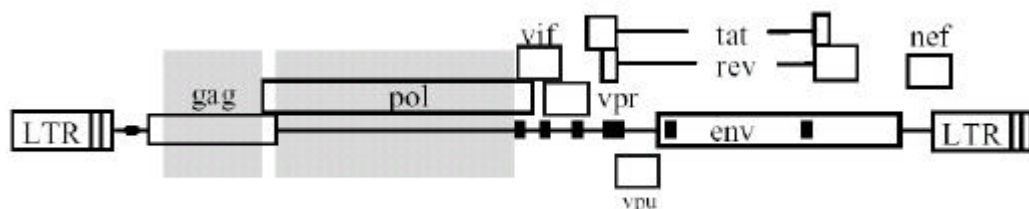
Abbildung D.-23. Schematische Gesamtdarstellung der Ergebnisse nach Transfektion mit den GFP-Konstrukten unter dem Einfluss cis- und trans-aktiver Elemente. Die Tendenzen der Resultate der GFP-Expression sind in Form von Balkendiagrammen („schlechte“, „gute“, „sehr gute“ Expression) wiedergegeben, die vom Northern Blot (nukleäre / zytoplasmatische Fraktion) als Bandenschema. Zytopl. = Zytoplasma.

## D.4. Teilkonzept III: Bedeutung des Kodongebrauchs für die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen der Replikation von chimären HI-Proviren

In diesem letzten Abschnitt sollte der Einfluss des HI-viralen Kodongebrauchs auf die zeitlich regulierte Genexpression während der HIV Replikation untersucht werden.

*Hintergrund:* In der vorausgegangenen Doktorarbeit von Marcus Graf („Untersuchungen über das Zusammenspiel von *cis*-aktiven Sequenzen und viralen transaktiven Proteinen bei der Expression später HIV-1 Genprodukte: Grundlage zur Entwicklung sicherer und effektiver Vektoren zur DNA-Vakzinierung und lentiviralen Gentherapie“, 2000) wurde ausgehend von pHX10 ein chimäres provirales Konstrukt (*HX<sub>syngagpol</sub>*, kurz: *HXsyn*) hergestellt, dessen Gag/Pol-Leserahmen an die Kodonwahl von hochexprimierten Säugetiergenen angepaßt wurde, ohne jedoch (i) Spleißstellen (innerhalb des 5'-LTR sowie die Spleißstellen für *vif* am 3'-Ende des *pol*-Gens), (ii) die für den Leserastersprung zwischen *gag* und *pol* notwendige „slippery site“ und (iii) die Verpackungssequenz  $\psi$  zu zerstören. In ersten Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die p24<sup>CA</sup>-Expression des *HXsyn*-Plasmides im Vergleich zum Wildtyp stark abnahm. Führt man die Transfektion allerdings in Gegenwart des Tat-Proteins (anhand HeLa-Tat-Zellen) durch, konnte die Expression von p24<sup>CA</sup> zum Teil wiederhergestellt werden. Diese ersten Experimente im proviralen Kontext decken sich mit der Annahme, dass die Kernretention später Transkripte sowohl auf die Kodonwahl als auch auf ineffizientes Spleißen zurückzuführen ist. Die beobachtete unterschiedliche p24<sup>CA</sup>/Pr55<sup>gag</sup>-Expression deutet - trotz der vorhandenen ineffizienten Spleißstellen - auf einen sofortigen Kernexport des ungespleißten Primärtranskriptes nach Transfektion mit *HXsyn* hin. Dies würde zur Folge haben, dass keine regulatorisch wirksamen frühen Proteine (Tat, Rev, Nef) mehr gebildet werden können. Insbesondere das Fehlen des Tat-Proteins wirkt sich negativ auf die virale Genexpression aus, da eine Tat-vermittelte Transaktivierung des proviralen Promoters ausbleibt. In Zellen, die Tat konstitutiv herstellen, konnte deshalb die Repression der viralen Genexpression teilweise überwunden werden.

Deshalb sollte - zusätzlich basierend auf den Ergebnissen der chimären *gag*-Reporterkonstrukte - im proviralen Umfeld die Bedeutung der AT-reichen Sequenz im Leserahmen von *gag* und *pol* untersucht werden.



**Abbildung D.-24. Schematische Darstellung des *HXsyngagpol* (= *HXsyn*)-Konstruktes.** *HXsyn* wurde von Marcus Graf während seiner Doktorarbeit angefertigt (RIMMH, 2000). Der kodonoptimierte Sequenzbereich ist grau hinterlegt.

### D.4.1. Herstellung der chimären HI-Proviruskonstrukte

In Analogie zu den unter D.2.1.1. vorgestellten chimären *gag*-Konstrukten, wurden drei chimäre Proviren erzeugt, in denen bestimmte Sequenzbereiche innerhalb von *gag* an die Kodonwahl von hochexpremierenden Säugetiergenen angepaßt wurden. Die synthetischen Sequenzen wurden mittels PCR aus dem *syngag*-Plasmid amplifiziert (Primersequenz siehe Material). Die erzeugten PCR-Fragmente wurden nach geeignetem Verdau über die entstandenen *sticky ends* in den - mit demselben Enzymen geschnittenen - *plin8p55Δ4* Vektor (Ralf Wagner, Doktorarbeit, 1992) ligiert.

Betrachtet man die Abfolge der singulären Schnittstellen im *HX10*-Provirus, so ergibt sich ausgehend vom ATG-Kodon (112 bp) von *gag* folgende Reihenfolge (die Basenpaarnummerierung bezieht sich auf die kodierende Sequenz und damit auf den BH10 Klon): *Cla* I (154 bp) - *Spe* I (830 bp) - *Apa* I (1333 bp) - „*slippery site*“ - *Bcl* I (1788 bp).

Die Daten von Cui *et al.* weisen allerdings darauf hin, dass für eine sichere Verpackung der HI-viralen RNA auch die ersten 255 nt innerhalb des *gag*-Leserahmens notwendig sind (Cui *et al.*, 1999). Damit erschien es uns notwendig, den Bereich zwischen 154 bp und 830 bp von *HX10* auf das Einfügen möglicher weiterer singulärer Schnittstellen zu untersuchen. Da möglichst früh am 5'-Ende die Chimärisierung beginnen sollte, wurde die *Nsp* V-Schnittstelle an Position 337 bp ausgewählt. Diese Schnittstelle wurde in den *plin8p55Δ4* Vektor anhand „*site-directed*“ Mutagenese eingefügt („*plin8p55Δ4* + *Nsp* V“) (Mutageneseprimer siehe Material). Damit standen uns folgende Schnittstellen für die Herstellung der chimären Proviren zur Verfügung: *Cla* I (154 bp) - *Nsp* V (337 bp) - *Spe* I (830 bp) - *Apa* I (1333 bp) und *Bcl* I (1788 bp).

Aus dieser Reihenfolge lassen sich die Primerpaare für die drei entworfenen chimären Proviren ableiten. Die Namensgebung „*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsynSpe-Apa*“ bezieht sich dabei auf den Bereich zwischen den Schnittstellen, der die kodonadaptierte Sequenz beinhaltet. Die Konstrukte wurden mit folgenden Primerpaaren hergestellt, wobei *for* den *forward*-, *rev* den *revers*-Primer bezeichnet; - die chimären Proviruskonstrukte sind unterstrichen: *HXsynCla-Spe*: *Cla-for* / *Spe-rev*, *HXsynNsp-Spe*: *Nsp-for* / *Spe-rev*, *HXsynSpe-Apa*: *Spe-for* / *Apa-rev*.

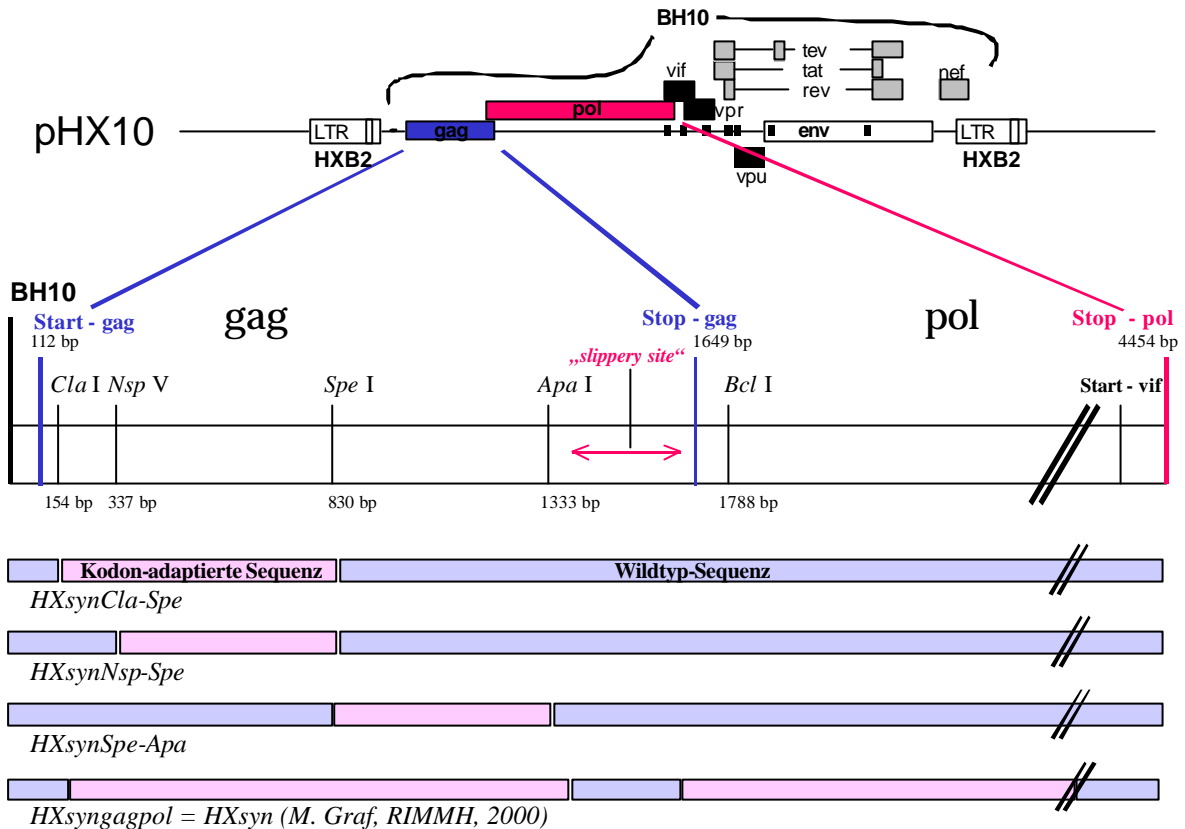
Alle Klonierungen wurden durch Sequenzierungen überprüft (Sequenzierprimer siehe Material). Die so gewonnenen *plin8p55Δ4* / + *Nsp* V – chimären proviralen Plasmide wurden zuletzt mit *Cla* I und *Bcl* I verdaut und - nach Auftrennung über ein Agarose-Gel und Reinigung über *Qiagen*-Säulchen - über diese Schnittstellen in *pHX10* kloniert.

Für die folgenden Studien wurde die provirale DNA in GM2163 Bakterien transformiert. Daraus isolierte DNA wurde dann mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *Hind* III charakterisiert und nochmals sequenziert (Sequenzierprimer siehe Material).

Im Nachfolgenden werden die *pHX10-HXsyn(Cla-Spe*-, *Nsp-Spe*-, *Spe-Apa*-)-Plasmide dem kodonmodifizierten *gag*-Gen entsprechend mit *HXsyn(Cla-Spe*, *Nsp-Spe*, *Spe-Apa*) abgekürzt. In Analogie zu dieser Schreibweise wird *pHX10* als *HX10* bezeichnet.

Bei der nachfolgenden Schilderung der Ergebnisse werden die Proviren, die aus *HXsynCla-Spe*-, *HXsynNsp-Spe*-, *HXsynSpe-Apa*-, *HX10*- und *HXsyn*-transfizierten Zellen gebildet werden, als Proviren „*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“, „*HXsynSpe-Apa*“, „*HX10*“ und „*HXsyn*“ bezeichnet.





**Abbildung D.-25. Schematische Darstellung der Konstruktion der chimären Provirusplasmide mit den ihnen zugrundeliegenden singulären Schnittstellen.** Als Matrize der Klonierungen diente hierbei das Provirusplasmid pHX10, welches die provirale Sequenz von BH10 (accession number: M15654) mit den flankierenden LTR-Regionen des Isolates HXB2 enthält (Ratner et al., 1987). Die „slippery site“ zwischen gag und pol ist stark vergrößert dargestellt.

## D.4.2. Expression der chimären HI-Proviren und Nachweis ihrer RNA

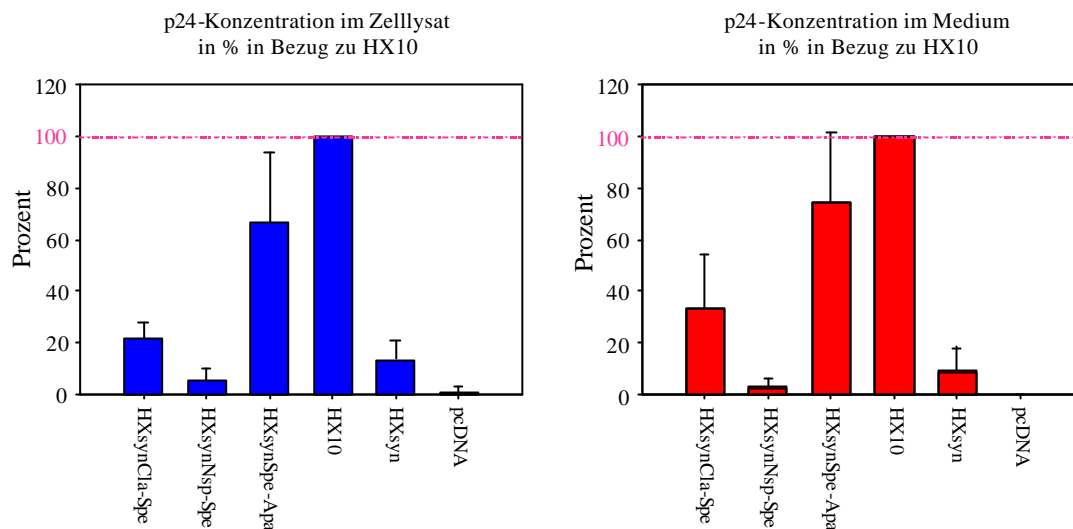
### D.4.2.1. Protein-Expression der chimären HI-Proviren

Zur genaueren Charakterisierung der chimären Proviruskonstrukte sollte ihr Expressionsprofil mit dem mit HX10 transfizierten Zellen verglichen werden. Dazu wurden humane H1299-Zellen transient mit HXsynCla-Spe, HXsynNsp-Spe, HXsynSpe-Apa, HX10 (als Positivkontrolle), HXsyn und pcDNA (als Negativkontrolle) transfiziert. Die Zellen und Überstände wurden jeweils nach 60 Stunden geerntet und in einem p24 Capture Assay-ELISA (nach Stoiber) ausgewertet. Desweiteren wurden die Zelllysate und aus dem Überstand über 20% Saccharosekissen angereicherte VLPs anhand HIV-spezifischer Antikörper im Western Blot analysiert.

Während der sogenannten späten Phase der Replikation erfolgt bei HIV-1 die Synthese der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine, die neben Env zur Ausknospung unreifer Viruspartikel benötigt werden. Während der Maturation werden dann aus den Gag-Vorläuferproteinen die Matrix- (p17), Capsid- (p24), Nucleocapsid- (p7) und Link- (p6) Proteine herausgespalten. In einem ersten Versuch wurde deshalb die gag-Expression der chimären proviralen Konstrukte analysiert.



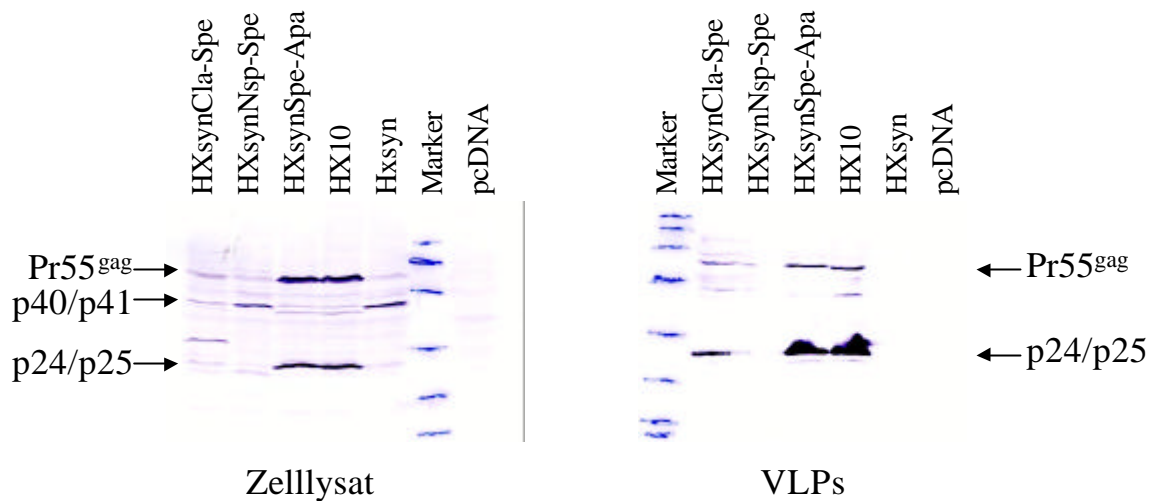
p24-Konzentration im Zelllysats und Kulturüberstand von transfizierten H1299-Zellen:



**Abbildung D.-26. p24-Konzentration im Zelllysats und Kulturüberstand von H1299-Zellen nach Transfektion mit proviralen DNA-Plasmiden.** Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; 5 Petrischalen pro Konstrukt). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit 30  $\mu$ g Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode durchgeführt. Nach 60 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Jeweils 50 ml Kulturüberstand wurde durch ein 20% Saccharosekissen sedimentiert und in 100  $\mu$ l PBS (ohne bivalente Ionen) resuspendiert. Für die interne Standardisierung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Der p24 Capture Assay ELISA (nach Stoiber) wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Abbildung gibt den Mittelwert mit Standardabweichung von sechs unabhängig voneinander durchgeführten Transfektionen im Vergleich zu der p24-Expression von HX10 (auf 100% gesetzt) wieder (jeweils drei verschiedene DNA-Präparationen in zwei Transfektionen getestet). Die p24-Konzentration lag nach Transfektion mit HX10 im Zelllysats bei rund 600 ng/ml, im Kulturüberstand bei rund 20 ng/ml.

Die p24-Expression war nach Transfektion mit *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* schwach (5 bzw. 13% zum Wildtyp Niveau) detektierbar. *HXsynCla-Spe*-transfizierte Zellen zeigten im Durchschnitt 20% der Expressionsstärke, die mit *HX10* transfizierte Zellen aufwiesen. Dagegen erreichte die p24-Expression nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* bis zu 93% vom Wildtyp Niveau. Die Sekretionsraten der transfizierten Zellen waren mit ihren Expressionswerten vergleichbar. Dies lässt darauf schließen, dass die nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* und *HXsynSpe-Apa* produzierten Pr55<sup>gag</sup>-Vorläuferproteine korrekt und analog der Wildtyp-Situation prozessiert und als Virus-ähnliches Gag-Partikel (*virus-like partikel*, VLP) abgeschnürt werden. Nach Transfektion mit *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* wird wenig Gag exprimiert, so dass erwartungsgemäß dessen Sekretion im Überstand nur in geringen Mengen (3 bzw. 9% zum Wildtyp Niveau) nachzuweisen ist. Diese Daten sollten auch mit Hilfe des monoklonalen p24-Antikörpers (16/4/2) im Western Blot überprüft werden.

Detektion des Pr55<sup>gag</sup>-Proteins mit seinen Prozessierungsderivaten im Western Blot:



**Abbildung D.-27. Nachweis von HI-viralem Gag im Zelllysate und in den im Kulturüberstand angereicherten VLPs nach Transfektion von H1299-Zellen.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; 5 Petrischalen pro Konstrukt). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit 30  $\mu$ g Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode durchgeführt. Nach 60 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Jeweils 50 ml Kulturüberstand wurde durch ein 20%-iges Saccharosekissen mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und in 100  $\mu$ l PBS (ohne bivalente Ionen) resuspendiert. Die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates erfolgte mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Für die SDS-PAGE wurden pro Ansatz 150  $\mu$ g Gesamtprotein bzw. 32  $\mu$ l des mit VLPs angereicherten Kulturüberstandes mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, drei Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 12,5%-iges SDS-Gel aufgetragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die Detektion des Pr55<sup>gag</sup>-Proteins und seiner Prozessierungsderivate erfolgte mit Hilfe des monoklonalen 16/4/2-Antikörpers und anschließende AP-Färbereaktion.

Der Western Blot zeigt die Expression (Zelllysate) und Sekretion (VLPs) von Pr55<sup>gag</sup> und seinen Prozessierungsderivaten (p41: Polyprotein von p17 + p24 bzw. p40: Polyprotein durch Translationsbeginn an gag interner IRES (lokalisiert am 5' Ende von p24); p24 + p1 + p7 + p2 + p6 bzw. prozessiertes p24) aus H1299-Zellen 60 Stunden nach Transfektion mit proviraler Plasmid-DNA. Die stärkste Expression konnte nach Transfektion mit HXsynSpe-Apa und HX10 erzielt werden, dabei zeigen mit HXsynSpe-Apa transfizierte Zellen dasselbe Prozessierungsmuster des Gag-Vorläuferproteins wie die mit Wildtyp-HX10 transfizierten Zellen auf. Die Expressionraten von Gag nach Transfektion mit HXsynCla-Spe, HXsynNsp-Spe und HXsyn sind miteinander vergleichbar, aber im Vergleich zu mit HX10 transfizierten Zellen auf einem sehr geringen Niveau. Die Prozessierung des nach Transfektion mit HXsynNsp-Spe und HXsyn produzierten Pr55<sup>gag</sup>-Proteins scheint ähnlich fehlerhaft zu sein, da bei beiden Transfektionen gleichermaßen p41 nachzuweisen, aber p24 kaum noch zu detektieren ist. Das Verhältnis von Pr55<sup>gag</sup> zu p24 entspricht nach Transfektion mit HXsynCla-Spe dem von HX10-transfizierten Zellen. Allerdings ist noch eine weitere dominante Bande zu erkennen, die auf Höhe von etwa 30 kDa läuft. Sie könnte ein Polyprotein von p24 mit p1 und p7 repräsentieren. Interessant ist auch, dass eine p41/p40 Doppelbande nur nach Transfektion mit HXsynSpe-Apa und HX10

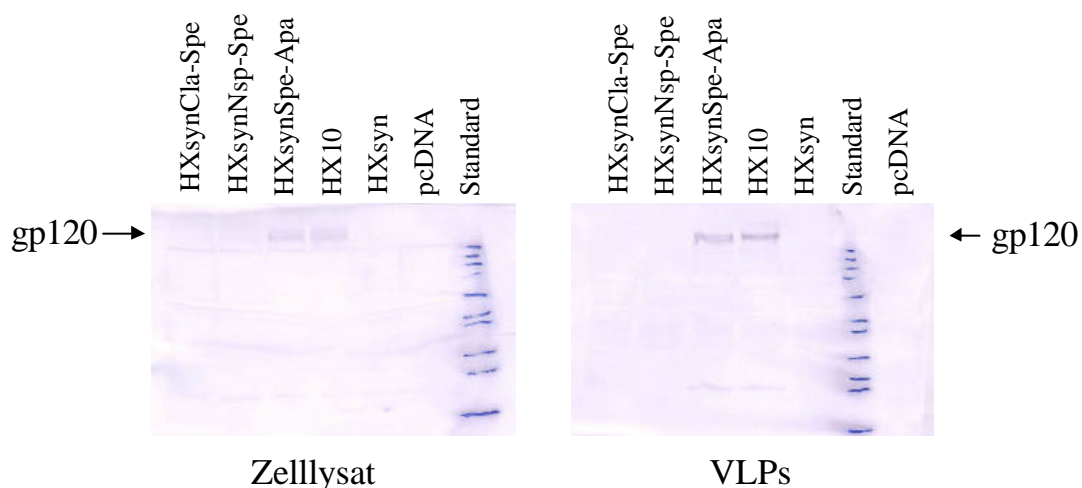
zu erkennen ist. Bei den anderen drei Proviren ist dagegen im Western Blot nur prozessiertes p41 nachzuweisen.

Im Überstand ist Pr55<sup>gag</sup> und p24 nur noch nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynSpe-Apa* und *HX10* detektierbar. Das Verhältnis von Pr55<sup>gag</sup> zu p24 liegt hierbei bei mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* transfizierten Zellen eindeutig auf der Seite des prozessierten p24. Nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* ist diese Relation fast ausgeglichen, was auf einen Prozessierungsfehler von Gag rückschließen läßt.

Bemerkenswert ist weiter, dass der Western Blot, der die Expression aus H1299-Zellen 72 Stunden nach Transfektion darstellt (nicht gezeigt), bei mit *HXsynCla-Spe* transfizierten Zellen nicht mehr die etwa 30 kDa große Bande zeigt.

Die Bindung der HI-Viren an ihre Zielzellen erfolgt durch eine spezifische Interaktion von viralem gp120 mit zellulärem CD4. Deshalb wurde ebenfalls der Nachweis von Env nach Transfektion von H1299-Zellen mit chimären proviralen Plasmiden im Zelllysats und im Überstand durchgeführt.

#### Detektion von Env im Western Blot:



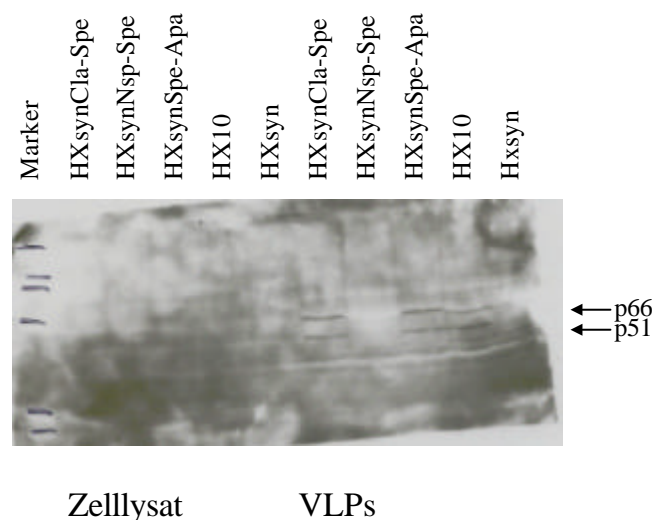
**Abbildung D.-28. Nachweis von HI-viralem Env im Zelllysats und in den im Kulturüberstand angereicherten VLPs nach Transfektion von H1299-Zellen.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; 5 Petrischalen pro Konstrukt). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit 30 µg Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode durchgeführt. Nach 60 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Jeweils 50 ml Kulturüberstand wurden durch ein 20%-ige Saccharosekissen mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und in 50 µl PBS (ohne bivalente Ionen) resuspendiert. Die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates erfolgte mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Für die SDS-PAGE wurden pro Ansatz 150 µg Gesamtprotein bzw. 32 µl des mit VLPs angereicherten Kulturüberstandes mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, drei Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die Detektion des Env-Proteins (gp120) erfolgte mit Hilfe des monoklonalen Env-Antikörpers und anschließender AP-Färbereaktion.

Die Env-Expression und -Sekretion war nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* gleich stark. Nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* gelang der Nachweis von gp120 im

Überstand nur sehr schwach nach Anreicherung über ein Saccharosekissen (im WB mit AP-Färbung fast nicht detektierbar; bestätigt anhand ECL-Färbung - nicht dargestellt). Die Gag-Vorläuferproteine und Env-Proteine ordnen sich während der Replikation an die Plasmamembran an und interagieren miteinander, bevor es schließlich zur Ausknospung unreifer Viruspartikel kommt. Da mit *HXsynCla-Spe* transfizierten Zellen schon eine sehr geringe Pr55<sup>gag</sup>-Sekretion zeigten, liegt hier die Vermutung nahe, dass zu wenig Viruspartikel vorliegen, um effektiv Env nachweisen zu können. Nach Transfektion mit *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* konnte keine Env-Expression anhand des Western Blots detektiert werden. Die mit diesen chimären Konstrukten transfizierten Zellen zeigten ebenfalls keine Gag-Partikel im Überstand (Western Blot). Insofern ist es möglich, dass hier Env bereits unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Während der Maturation von HIV kommt es zur autokatalytischen Spaltung der Protease aus dem Pol-Vorläuferprotein. Diese prozessiert dann neben den bereits erwähnten Gag-Proteinen auch die von Pol, so dass es zur Freisetzung der Reversen Transkriptase (RT) und Integrase kommt. Deshalb wurde ebenfalls der Nachweis der Reversen Transkriptase, die zur reversen Transkription des viralen einzelsträngigen RNA-Genoms in eine doppelsträngige DNA notwendig ist, durchgeführt.

Detektion der RT mit ihren zwei Untereinheiten p66 und p51 im Western Blot:

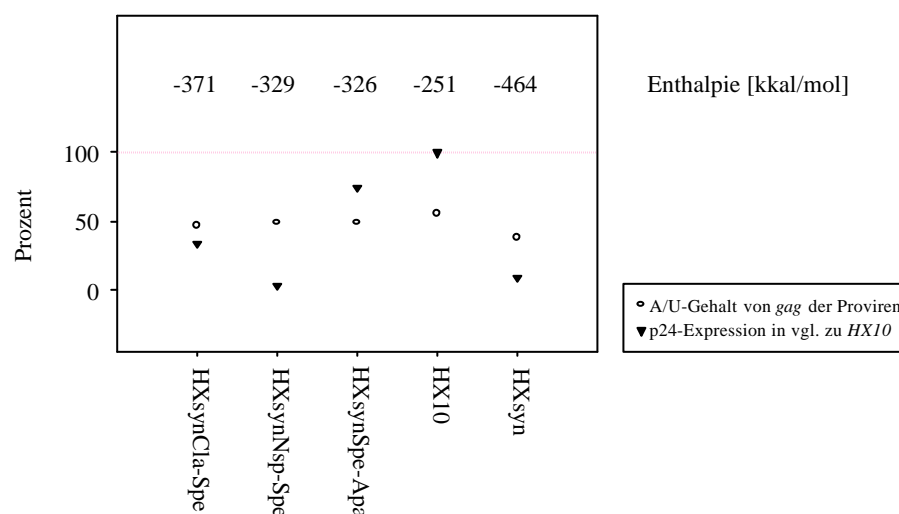


**Abbildung D.-29. Nachweis der HI-viralen RT im Zelllysate und in den im Kulturüberstand angereicherten VLPs nach Transfektion von H1299-Zellen.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; 5 Petrischalen pro Konstrukt). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit 30 µg Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode durchgeführt. Nach 60 Stunden Inkubation wurden die Zellen schließlich geerntet und mit RIPA-Lysepuffer wie im Methodenteil beschrieben aufgearbeitet. Jeweils 50 µl Kulturüberstand wurde durch ein 20%-iges Saccharosekissen mittels Ultrazentrifugation sedimentiert und in 50 µl PBS (ohne bivalente Ionen) resuspendiert. Die quantitative Proteinbestimmung des Zelllysates erfolgte mit dem Bradford-Protein-Assay nach Angaben des Herstellers. Für die SDS-PAGE wurden pro Ansatz 150 µg Gesamtprotein bzw. 32 µl des mit VLPs angereicherten Kulturüberstandes mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, drei Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen. Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die Detektion des RT-Proteins in Form von p66 und p51 erfolgte mit Hilfe des monoklonalen RT-Antikörpers und anschließender ECL-Färbereaktion.

Die Detektion der Reversen Transkriptase ist nur im Überstand von transfizierten Zellen möglich, da sie erst während der Maturation der Viren gebildet wird. Die Detektion des RT-Proteins in Form von p66 und p51 erfolgte nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* und *HXsynSpe-Apa* wie bei mit Wildtyp-*HX10* transfizierte Zellen. Deshalb wird vermutet, dass auch die Protease bei diesen zwei chimären Proviren normal funktionsfähig ist. Ein RT-Nachweis aus mit *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* transfizierten Zellen war schon aufgrund der sehr geringen Ausbildung der Gag-Partikel nicht zu erwarten, da man damit wohl schon unterhalb der Nachweisgrenze für die Reverse Transkriptase liegt. Deshalb kann für diese Proviren keine Aussage über ihre Prozessierung gemacht werden.

#### D.4.2.2. RNA-Enthalpie vom gag-Gen der HI-Proviren

Vergleicht man die RNA-Enthalpien (siehe Grafik D.-30.) des *gag*-Gens der chimären Proviren untereinander und setzt die von *HX10* auf 100% (-251 kkal/mol), so hat *HXsynCla-Spe* einen *gag*-Enthalpiewert von 148% (-371,2 kkal/mol), *HXsynNsp-Spe* einen von 131% (-329,1 kkal/mol), *HXsynSpe-Apa* einen von 130% (-326 kkal/mol) und *HXsyn* einen von 185% (-464 kkal/mol). Stellt man die Prozentwerte den jeweils erreichten p24-Sekretionskonzentrationen der chimären Proviren gegenüber, zeigt es sich, dass die Stabilität der *gag*-RNA-Sekundärstruktur keinen Einfluss auf die p24-Expressionsrate während der zeitlich regulierten HIV-Replikation hat. Dies weist daraufhin, dass neben *cis*-aktiven RNA Elementen auch *trans*-aktive Faktoren an der Rev/RRE-abhängigen Expression beteiligt sind. Desweiteren können Computeranalysen keinen Zusammenhang zwischen dem A/U-Gehalt der proviralen *gag*-RNA und den jeweiligen Expressionsraten der Proviren aufzeigen (siehe Grafik D.-30.). Trotz annähernd gleichen A/U-Gehalt des *gag*-Gens der chimären Proviren (*HXsynCla-Spe*: 46,0%, *HXsynNsp-Spe*: 48,8%, *HXsynSpe-Apa*: 48,8%) (Anmerkung: *HX10*: 55,9% A/U, *HXsyn*: 37,2% A/U) zeigen sie große Unterschiede in ihrer p24-Sekretion. Wie bereits beschrieben, erreichen mit *HXsynCla-Spe* transfizierte Zellen ca. 20%, mit *HXsynNsp-Spe* transfizierte Zellen ca. 5% und mit *HXsynSpe-Apa* transfizierte Zellen ca. 93% der p24-Expression von mit *HX10* transfizierte Zellen.



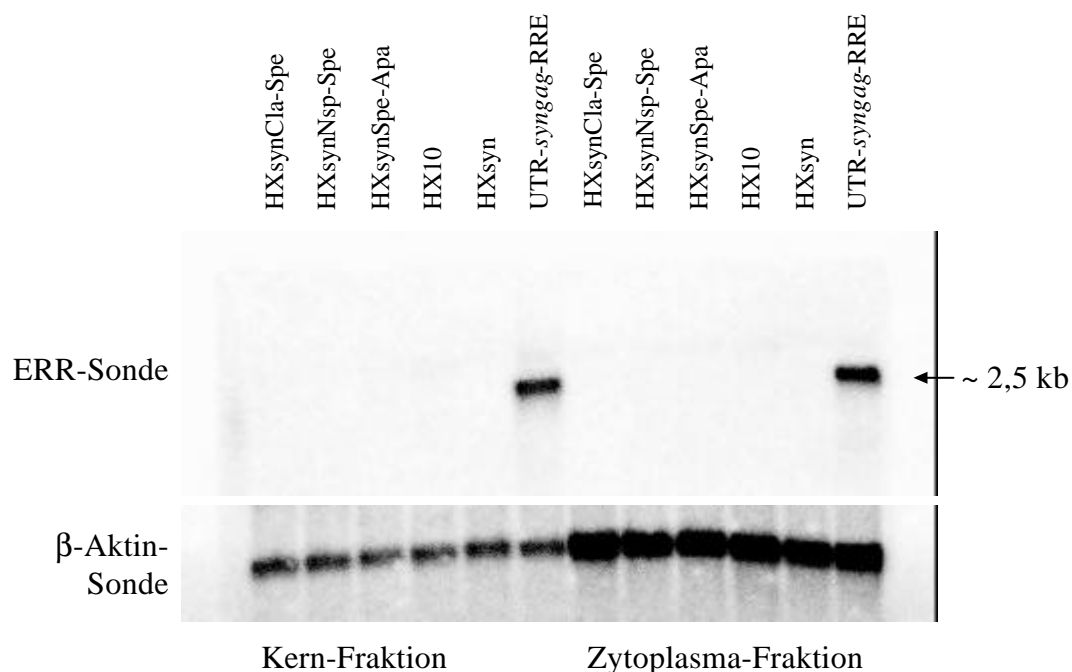
**Abbildung D.-30. Gegenüberstellung der RNA-Enthalpien, der nach Transfektion erreichten p24-Expressionsraten und des A/U-Gehaltes von gag innerhalb der chimären Proviruskonstrukte.** Die RNA-Enthalpien wurden mit Hilfe der Internetseite <http://www.genebee.msu.su> anhand der dortigen Standardeinstellungen berechnet. Im Vergleich

dazu sind die nach Transfektion mit den chimären Proviruskonstrukten jeweils erreichten p24-Expressionraten aus dem Zellkulturüberstand angegeben, wobei der Wert von HX10-transfizierten Zellen für die interne Standardisierung auf 100% gesetzt wurde. Desweiteren ist in der Graphik der A/U-Gehalt des gag-Genes angezeigt.

#### **D.4.2.3. RNA-Verteilung nach Transfektion mit den chimären HI-Proviruskonstrukte**

Zur weiteren Charakterisierung der chimären Proviren sollte ihre RNA-Verteilung mit denen von mit HX10 transfizierten Zellen verglichen werden. Dazu wurden 293 T-Zellen transient mit HXsynCla-Spe, HXsynNsp-Spe, HXsynSpe-Apa, HX10, HXsyn und UTR-syngag-RRE (zur Kontrolle der Bindungseffizienz der ERR-Sonde) transfiziert. Die Zellen wurden jeweils nach zwei, vier, sechs, neun, zwölf und 15 Stunden geerntet, die RNA isoliert und in eine nukleäre und zytoplasmatische Fraktion separiert. Anschließend erfolgte die Auswertung der RNA im Northern Blot anhand Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten ERR-Sonde, die zur RRE Sequenz komplementär ist. Um die RNA-Präparationen vergleichen zu können, wurde die RNA in einem zweiten Auftrag mit einer Sonde hybridisiert, die spezifisch an die zelluläre  $\beta$ -Aktin-RNA bindet. Mit dem Nachweis der  $\beta$ -Aktin-RNA kann man somit indirekt auf die Gesamt-RNA-Ausbeute schließen und die erzielten Signale entsprechend normalisieren.

#### RNA-Verteilung sechs Stunden nach Transfektion:



**Abbildung D.-31. Northern Blot-Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fraktionen nach Transfektion von proviralen DNA-Plasmiden [Beschreibung siehe D.-32.].**



RNA-Verteilung zwölf Stunden nach Transfektion:

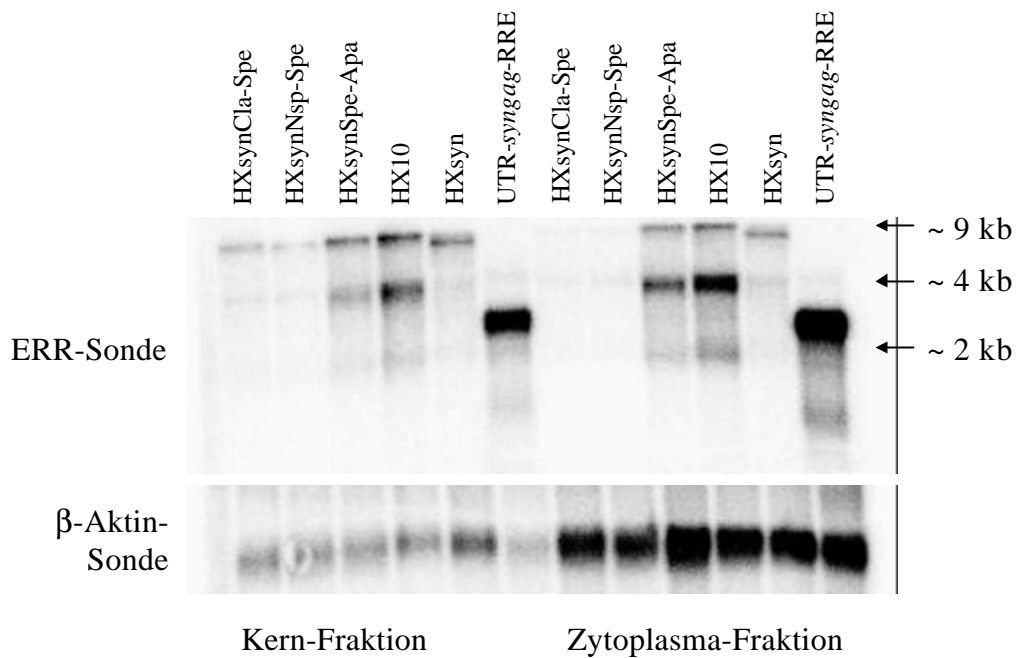


Abbildung D.-32.

	Kern-Fraktion					Zytosol-Fraktion				
	<i>Cla</i>	<i>Nsp</i>	<i>Spe</i>	<i>HX10</i>	<i>HXsyn</i>	<i>Cla</i>	<i>Nsp</i>	<i>Spe</i>	<i>HX10</i>	<i>HXsyn</i>
	„counts“ x mm <sup>2</sup>									
ungespl.	43273	24968	92675	143279	100017	8934	9917	73603	94453	77344
einfach	20491	16690	83682	185658	36563	13789	17141	171103	319394	43714
mehrfach	13436	8287	31355	58818	22401	7654	8366	65103	129007	31069
b-Aktin	183863	175822	186261	201258	298702	598916	543817	873574	711506	809883
	„counts“ x mm <sup>2</sup> - standardisiert zur b-Aktin-Sonde (bezogen zum Wert der b-Aktin-RNA aus <i>HX10</i> -transfizierten Zellen)									
ungespl.	47367	28580	100137	143279	67389	10613	12975	59948	94453	67949
einfach	22430	19105	90420	185658	24635	16381	22427	139359	319394	38404
mehrfach	14707	9486	33880	58818	15093	9093	10946	53025	129007	27295
	prozentuelles Verhältnis der RNA-Typen quantifiziert zur jeweiligen RNA-Fraktion aus <i>HX10</i> -transfizierten Zellen									
ungespl.	33,06	19,95	69,89	100,00	47,03	11,24	13,74	63,47	100,00	71,94
einfach	12,08	10,29	48,70	100,00	13,27	5,13	7,02	43,63	100,00	12,02
mehrfach	25,00	16,13	57,60	100,00	25,66	7,05	8,48	41,10	100,00	21,16
	Verhältnis der drei RNA-Typen einer Fraktion zueinander (ausgehend von der ungespleißten RNA - berechnet mit den absoluten „counts“ x mm <sup>2</sup> ) (- die Wildtypsituation ist fettgedruckt dargestellt -)									
ungespl.	1,00	1,00	1,00	<b>1,00</b>	1,00	1,00	1,00	1,00	<b>1,00</b>	1,00
einfach	0,47	0,67	0,90	<b>1,30</b>	0,37	1,54	1,73	2,32	<b>3,38</b>	0,57
mehrfach	0,31	0,33	0,34	<b>0,41</b>	0,22	0,86	0,84	0,88	<b>1,37</b>	0,40

Tabelle D.-33.

Abbildung D.-32 und Tabelle D.-33:

D.-32. Northern Blot Analyse nukleärer und zytoplasmatischer RNA-Fractionen nach Transfektion von proviralen DNA-Plasmiden. Am Vortag der Transfektion wurden die 293 T-Zellen ausgesät ( $2 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; pro Konstrukt und Zeitpunkt der Ernte eine

*Petrischale*). Am nächsten Tag wurde mit 30 µg Plasmid-DNA nach der CaHPO<sub>4</sub>-Methode transfiziert. Nach zwei, vier, sechs, neun, zwölf und 15 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und die RNA wie im Methodenteil beschrieben isoliert und analysiert. Dabei wurden aus den Fraktionen jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

**Tabelle D.-33. Quantitative Auswertung der RNA-Verteilung zwölf Stunden nach Transfektion mit proviraler DNA.** Angegeben sind jeweils die absolut im sog. „Phosphor-Imager“ gezählten „counts“, die „counts“ nach Standardisierung zur **b**-Aktin-Sonde, der prozentuale Bezug quantifiziert zum jeweiligen Wert von mit HX10 transfizierten Zellen, als auch die RNA-Verteilung der drei HI-viralen RNAs nach Transfektion mit der proviralen Plasmid-DNA. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: Cla - HXsynCla-Spe, Nsp - HXsynNsp-Spe, Spe - HXsynSpe-Apa, ungespl. - ungespleißte RNA (ca. 9 kb), einfach - einfach gespleißte RNA (ca. 4 kb), mehrfach - mehrfach gespleißte RNA (ca. 2 kb).

Im Northern Blot konnte zwei bzw. vier Stunden nach Transfektion aus keinen Zellen eine RRE-spezifische RNA nachgewiesen werden. Zu diesen Zeitpunkten war nur die  $\beta$ -Aktin-RNA detektierbar (nicht dargestellt). RNA aus mit *UTR-syngag-RRE* transfizierten Zellen, welche zur Kontrolle der Bindungseffizienz der RNA-Sonde diente, ergab erst zum dritten Zeitpunkt der Ernte (sechs Stunden) ein positives RRE-Signal. In selber Weise gelang der Nachweis neun Stunden nach Transfektion (nicht dargestellt). RRE-spezifische RNA konnte nach Transfektion mit den proviralen Plasmiden erst zwölf Stunden nach dem Einbringen der DNA detektiert werden. Dabei gelang jeweils nach Transfektion mit allen proviralen Plasmiden der Nachweis der ungespleißten (ca. 9 kb), einfach (ca. 4 kb) und mehrfach (ca. 2 kb) gespleißten viralen RNA, teilweise allerdings in sehr niedrigen Konzentrationen (siehe Tabelle D.-33. - ausgedrückt in „counts“ x mm<sup>2</sup>).

(Der Nachweis der mehrfach gespleißten RNA (Rev, Tat) gelang deshalb mit der ERR-Sonde (RRE ist eigentlich nur im viralen Genom und in den mRNAs von Gag, Pol, Env, Vif, Vpr und Vpu vorhanden), da die Sequenz von Rev und Tat mit der der RRE-Sonde überlappt war.)

Die nukleäre RNA-Verteilung lag nur bei mit HX10 transfizierten Zellen auf der Seite der einfach gespleißten RNAs (Env, Vif, Vpr, Vpu), bei allen anderen transfizierten Zellen waren die ungespleißten RNAs (Gag, Gag/Pol, RNA-Genom) mehr oder weniger dominant. Im Zytoplasma waren dagegen nach Transfektion mit HXsynSpe-Apa und HX10 eindeutig die einfach gespleißten RNAs vorherrschend und weniger stark ausgeprägt nun auch bei mit HXsynCla-Spe und HXsynNsp-Spe transfizierten Zellen. Nur nach Transfektion mit HXsyn lag hier das RNA-Verhältnis immer noch auf Seiten der ungespleißten RNAs. Der Northern Blot, der schließlich mit der letzten RNA-Ernte (15 Stunden) durchgeführt wurde, zeigt denselben Nachweis wie der „12-Stunden-Blot“ (nicht dargestellt).

Wie bereits erwähnt, werden in der frühen Phase der Transkription von HIV-1 mehrfach gespleißte RNAs generiert und damit zunächst ausschließlich mehrfach gespleißte virale RNA-Transkripte aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. Im dargestellten Northern Blot sind aber bereits bei der Wildtyp-Kontrolle alle drei RNA-Typen von HIV-1 detektierbar. Damit konnte der Unterschied zwischen der frühen Synthese mehrfach gespleißter mRNAs und der späten Synthese einfach gespleißter bzw. ungespleißter mRNAs im Northern Blot zwar nicht dargestellt werden, dennoch zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den jeweils dominanten RNA-Spezies bei den Proviren. Nur nach Transfektion mit HXsynSpe-Apa und HX10 überwiegen im Zytoplasma eindeutig die einfach gespleißten RNAs. Berücksichtigt man den Nachweis von  $\beta$ -Aktin, der für die



Kernfraktion deutlich schwächer ist als bei den Proben aus dem Zytoplasma, so kann weiter gesagt werden, dass bei mit *HXsynCla-Spe* und *HXsynNsp-Spe* transfizierten Zellen kein effektiver Export der viralen RNA stattfindet. Dies erkennt man auch bei der tabellarischen Aufstellung an den rund bis zur Hälfte geringeren prozentualen Werten der RNAs im Zytoplasma - bezogen auf mit *HX10* transfizierten Zellen - gegenüber den im Kern erreichten. Dagegen werden die RNAs nach Transfektion mit *HXsyn* in das Zytoplasma transportiert, so dass das Verhältnis dieser RNAs zum Wildtyp im Kern und Zytoplasma gleich bleibt. Darüber hinaus scheint die ungespleißte RNA von mit *HXsyn* transfizierten Zellen sogar effizienter exportiert zu werden als seine einfach bzw. mehrfach gespleißten RNAs, da hier das Verhältnis zum Wildtyp gegenüber dem nukleären Wert um ca. 25% gestiegen ist. Das Verhältnis der Stärke der RRE-RNA-Banden nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* ist im Kern als auch im Zytoplasma gleich, wenn auch die der *HXsynSpe-Apa*-transfizierten Zellen immer schwächer sind als die des Wildtyps. Damit sollte der Unterschied in der Protein-Expression der chimären Proviren auf RNA-Ebene zurückzuführen sein. Inwieweit Kern-Degradierung, desolante Transkription, ineffektiver Export oder zytoplasmatischer Abbau dafür verantwortlich sind, steht zur Diskussion.

#### **D.4.3. Infektiösität der chimären HI-Proviren**

Zur weiteren Charakterisierung der chimären Proviren sollte ihre Infektiösität mit dem Wildtyp verglichen werden. Dazu wurden folgende zwei Versuche durchgeführt:

##### ***MAGI(multinuclear activation of galactosidase indicator)-Assay:***

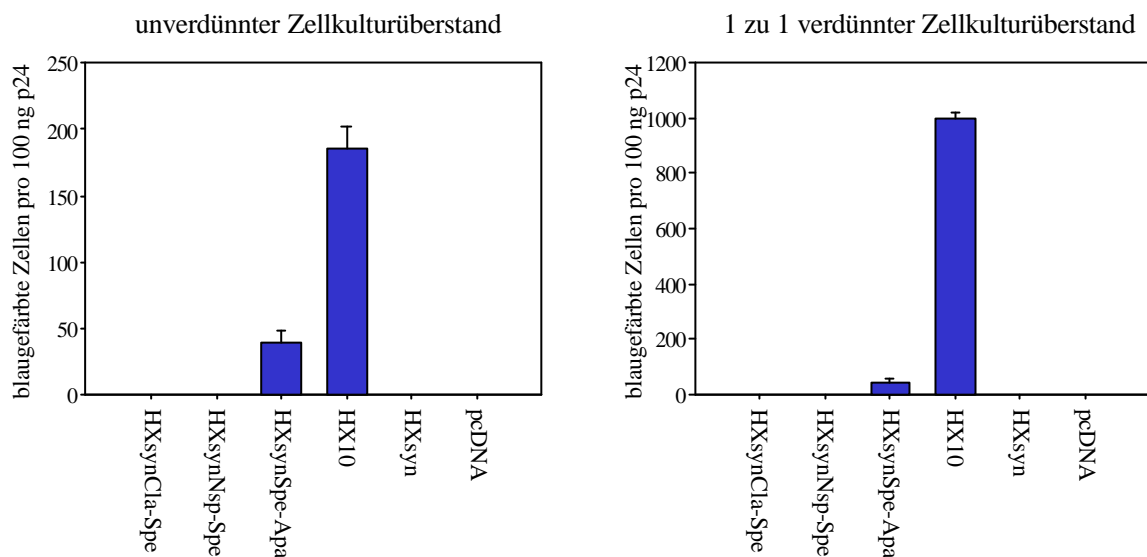
Hier erfolgt der indirekte Nachweis der Tat-Expression nach Infektion mit Provirus-Überstand mit Hilfe der Indikatorzelllinie HeLa-LTR- $\beta$ -Gal. Die CD4<sup>+</sup> HeLa-Zelllinie trägt ein in das Genom der Zelle integrierte Kopie des  $\beta$ -Galaktosidase Gens unter der Kontrolle des HI-viralen LTR-Promoters, der zunächst inaktiv ist. Nach erfolgreicher Infektion der Zelle durch die nach Transfektion freigesetzten Proviren wird als eines der ersten Genprodukte von HIV das Regulatorprotein Tat produziert. Dadurch wird der LTR-Promoter aktiviert und die  $\beta$ -Galaktosidase produziert. Die  $\beta$ -Galaktosidase trägt zudem eine artifizielle Kernlokalisierungssequenz, so dass nach Zugabe einer Substratlösung die  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden und somit infizierten Zellen an einer intensiven Blaufärbung der Zellkerne zu erkennen sind.

##### ***Titration des Provirus-Überstandes mit CEM-Zellen:***

Der erreichte Virustiter im Überstand von transfizierten H1299-Zellen wurde dadurch bestimmt, dass CEM-Zellen damit infiziert wurden. Dafür wurde eine serielle Verdünnung von Zellkulturüberstand im zehnfachen Ansatz auf CEM-Zellen gegeben. Nach siebentägiger Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und in einem p24 Capture Assay-ELISA (nach Stoiber) ausgetestet. Der reziproke Wert der Verdünnung, wobei in der Hälfte von zehn Ansätzen eine Virusreplikation nachweisbar war, ergab den Virustiter ausgedrückt als Dosis, bei der 50% der Gewebekultur infiziert wurden.

Für beide Versuche wurden humane H1299-Zellen transient mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe*, *HXsynSpe-Apa*, *HX10* (als Positivkontrolle), *HXsyn* und pcDNA (als Negativkontrolle) transfiziert. Die Überstände wurden jeweils nach 60 bis 72 Stunden geerntet und auf die jeweiligen Zellen gegeben und inkubiert. Hierbei wurde mit einer Verdünnungsreihe gearbeitet. Nach der entsprechenden Kultivierung wurden die Proben schließlich wie im Methodenteil erläutert analysiert. Zur internen Standardisierung wurde die Konzentration des p24-Capsid-Antigens im Kulturüberstand der H1299-Zellen in einem p24 Capture Assay-ELISA (nach Stoiber) bestimmt und bei der Auswertung der Daten berücksichtigt.

### Ergebnis: „MAGI“-Assay:



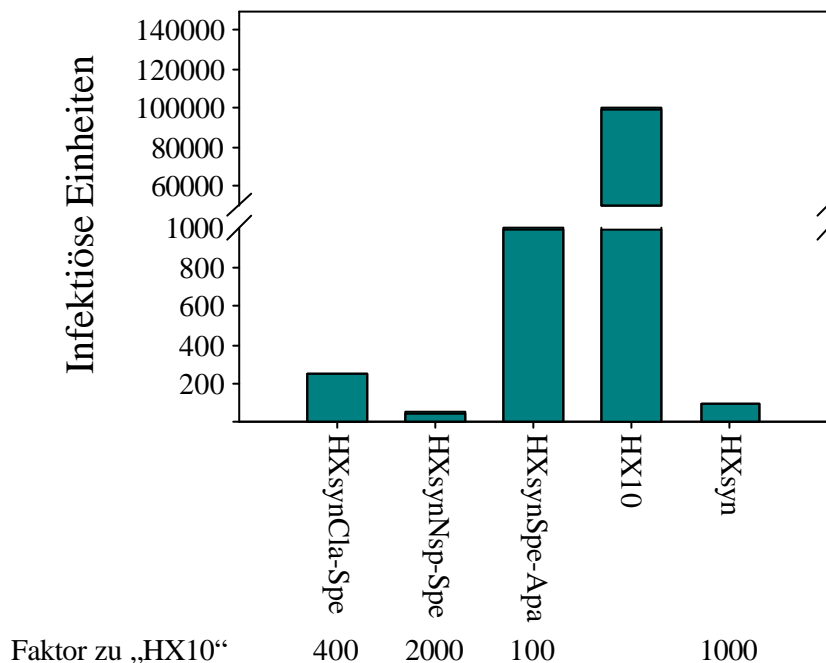
**Abbildung D.-34. „MAGI“-Assay.** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; 5 Petrischalen pro Konstrukt). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit 30  $\mu$ g Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode durchgeführt. Nach 60 bis 72 Stunden Inkubation wurde der Zellkulturüberstand geerntet auf die „MAGI“-Zellen gegeben ( $2 \times 10^4$  Zellen pro 48-Wellplatte; pro Verdünnung drei Ansätze). Hierbei wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Nach fünftägiger Inkubation wurde der „MAGI“-Assay wie im Methodenteil erläutert durchgeführt. Zur internen Standardisierung wurde ebenfalls die p24-Konzentration im Zellkulturüberstand der H1299-Zellen berücksichtigt. Die Grafik gibt das Ergebnis aus drei unabhängig voneinander durchgeführten „MAGI“-Assays wieder.

Mit dem Überstand von H1299-Zellen nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* konnte bei keiner Verdünnung eine Blaufärbung der „MAGI“-Zellen nach Zugabe der Substratlösung erreicht werden. Nur der Zellkulturüberstand der mit *HXsynSpe-Apa* bzw. *HX10* transfizierten H1299-Zellen führte bei der Auswertung zu Blauverfärbungen der Indikator-Zellen. Dabei wurde die Anzahl der jeweils ermittelten blauen Zellen auf die p24-Konzentration im eingesetzten Überstand bezogen (infizierte Zellen pro 100 ng p24). Nach Inkubation des unverdünnten Überstands der *HXsynSpe-Apa*-transfizierten Zellen war die Anzahl der blau gefärbten „MAGI“-Zellen um rund ein Fünftel (Mittelwert: 4,72; Standardabweichung: 1,37) geringer als bei der Positivkontrolle (*HX10*). Mit der 1 zu 1 - Verdünnung lag der Faktor zwischen beiden HI-Providenen bereits zum Teil

über 30 (Mittelwert: 23,26; Standardabweichung: 8,45). Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass sich nach Transfektion mit *HX10* im unverdünnten Überstand zu viele infektiöse HIV-1-Partikel gebildet haben, die aufgrund ihres hohen Virulenzverhaltens während der fünftägigen Inkubationszeit nach Infizierung schließlich zum Absterben der Indikator-Zellen führten. Damit lagen bei der Positivkontrolle weniger Zellen zum Auszählen vor, als beim Versuchsansatz mit dem Provirus „*HXsynSpe-Apa*“, was einen kleineren Unterschied im Infektiositätsfaktor ergibt. Die Auswertung der „*MAGI*“-Assays zeigt somit, dass neben dem Wildtyp nur die Viren, die vom chimären proviralen Konstrukt *HXsynSpe-Apa* gebildet werden, infektiös sind.

Dieses Ergebnis sollte durch Infizierung von Lymphozyten - ebenfalls mit Zellkulturüberstand nach Transfektion - bestätigt werden. Gleichzeitig sollte anhand einer seriellen Virusstockverdünnung der jeweilige Virustiter bestimmt werden.

### Ergebnis: Virustitration



**Abbildung D.-35. Virustitration:** Am Vortag der Transfektion wurden die H1299-Zellen ausgesät ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Petrischale; 5 Petrischalen pro Konstrukt). Am nächsten Tag wurde die Transfektion mit  $30 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA nach der  $\text{CaHPO}_4$ -Methode durchgeführt. Nach 60 Stunden Inkubation wurde der Zellkulturüberstand geerntet und in einer seriellen Verdünnung auf die CEM-Zellen gegeben ( $2 \times 10^4$  Zellen pro 48-Wellplatte; pro Verdünnung zehn Ansätze). Nach siebentägiger Inkubation wurde der Zellkulturüberstand von den CEM-Zellen abgenommen und in einem p24 Capture Assay ELISA (nach Stoiber) ausgetestet (nähere Beschreibung siehe Methodenteil). Zur internen Standardisierung wurde ebenfalls die p24-Konzentration im Zellkulturüberstand der H1299-Zellen berücksichtigt. Die Grafik gibt den von vier unabhängig durchgeführten Titrations maximal erreichten Titer sowie das Verhältnis der Virus-Titer gegenüber zum Wildtyp an.

Die Virustitration erbrachte für die chimären Proviren folgende infektiösen Einheiten unter Berücksichtigung der p24-Konzentration im Zellkulturüberstand der H1299-Zellen: „*HXsynCla-Spe*“: 250, „*HXsynNsp-Spe*“: 50 (drei mal 0), „*HXsynSpe-Apa*“: 1000, „*HX10*“: 100000 und „*HXsyn*“: 100. Anders als beim „*MAGT*“-Assay konnte hier für die Proviren „*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsyn*“ p24 im Überstand der CEM-Zellen detektiert werden. Allerdings besteht keine Möglichkeit zwischen von H1299- und CEM-Zellen sezerniertem p24 zu unterscheiden. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass beim ELISA für die Titrationsanalyse sezerniertes p24 aus den H1299-Zellen nachgewiesen wurde. Deshalb wurde in einem zusätzlichen Titrationsversuch die p24-Konzentration aus lysierten CEM-Zellen statt aus dem Überstand bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Virus-Titer: „*HXsynCla-Spe*“: 100, „*HXsynNsp-Spe*“: 0, „*HXsynSpe-Apa*“: 500, „*HX10*“: 100000 und „*HXsyn*“: 100. Diese Werte sind entweder überhaupt nicht oder nur um 50% niedriger als die zuvor bestimmten. Eine weitere Möglichkeit, den Unterschied in der Infektiosität zu erklären, ist der Einsatz unterschiedlicher Zelllinien (und somit verschiedener zellulärer Faktoren). Desweiteren wurden die Lymphozyten länger mit dem Kulturüberstand inkubiert (beim „*MAGT*“-Assay wird der Virusüberstand nur zwei Stunden auf die Zellen gegeben und wird dann durch frisches Medium ersetzt) und lagen in einer höheren Zellzahl vor.

Bemerkenswert ist hierbei noch, dass die Unterschiede der Titer der chimären Proviren annähernd der prozentualen Differenz zwischen ihrer p24-Expression (Abbildung D.-26.) entspricht.

#### **D.4.4. Replikationsverhalten der chimären HI-Proviren**

##### **D.4.4.1. Replikationsverhalten der chimären HI-Proviren im “Kurzzeitversuch”**

Um die Replikationsfähigkeit der chimären Proviren bestimmen zu können, wurden CEM-Zellen mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe*, *HXsynSpe-Apa*, *HX10* (als Positivkontrolle), *HXsyn* oder pcDNA (als Negativkontrolle) transfiziert und über einen Zeitraum von bis zu 30 Tagen kultiviert. Die Zellen wurden jeweils nach 48 Stunden 1 zu 1 gesplittet, wobei gleichzeitig Zellkulturüberstand für den p24 *Capture Assay*-ELISA (nach Stoiber) abgenommen wurde.

**Abbildung D.-36. Replikationsverhalten.**  $7,5 \times 10^6$  CEM Zellen wurden mit je 1 µg der Plasmide *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe*, *HXsynSpe-Apa*, *HX10*, *HXsyn* und pcDNA mittels FuGENE 6 nach Angaben des Herstellers transfiziert und über einen Zeitraum von 30 Tagen kultiviert. Die Zellen wurden jeweils nach 48 Stunden 1:1 gesplittet, wobei gleichzeitig Zellkulturüberstand für den p24 *Capture Assay*-ELISA (nach Stoiber) abgenommen wurde. Dargestellt sind alle vier - voneinander unabhängig durchgeführten - Versuche (Da für „*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsyn*“ keine Replikation nachgewiesen werden konnte, sind nur die Ergebnisse der Proviren „*HXsynSpe-Apa*“ und „*HX10*“ dargestellt.).

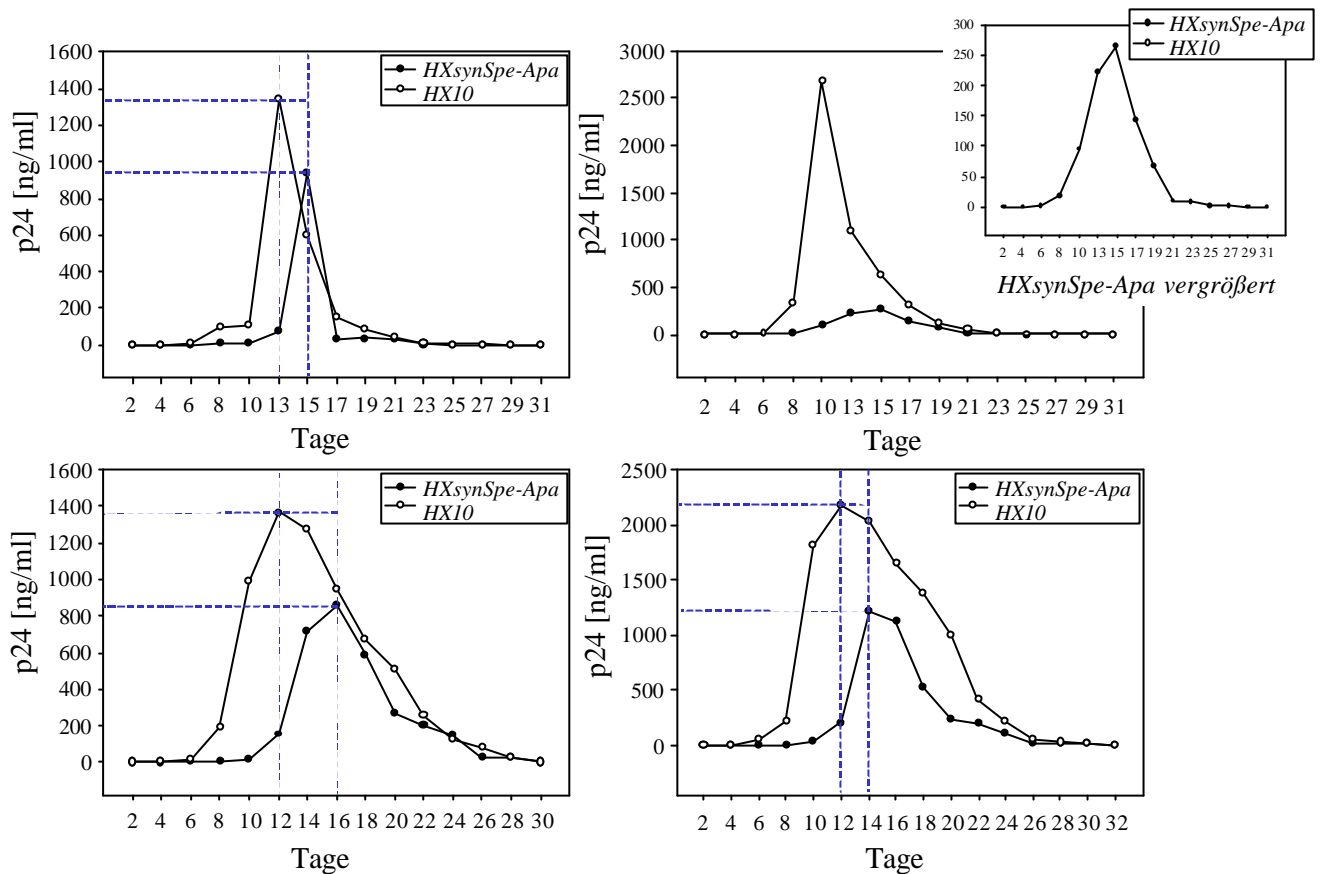


Abbildung D.-36. Replikationsverhalten.

Für die chimären Proviren „HXsynCla-Spe“, „HXsynNsp-Spe“ und „HXsyn“ konnte kein Replikationsverhalten nachgewiesen werden, da zu keinem Zeitpunkt p24 detektiert wurde. Da die Zellen bereits nach 48 Stunden zum ersten Mal gesplittet wurden, steht dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zur Titrationsanalyse. Hier wurden Kulturüberstände eingesetzt, die erst bis zu 72 Stunden nach der Transfektion von H1299-Zellen zum Infizieren der CEM-Zellen geerntet wurden und somit mehr sezerniertes p24 anreichern konnten. Der HXsynSpe-Apa-Provirus zeigt gegenüber dem Wildtyp stets eine leicht verzögerte Replikation (zwei bis vier Tage) mit ebenfalls reduzierten p24 Maximalwerten (ca. 60% von HX10-transfizierten Zellen).

#### D.4.4.2. Mutationen in der gag-Sequenz der chimären HI-Proviren nach Kultivierung im „Langzeitversuch“

Neben der Analyse der Replikationskinetik wurde auch das Replikationsverhalten der chimären Provirus-Varianten im „Langzeit“-Zellkulturexperiment verfolgt. Eine Steigerung der Replikationsfähigkeit in Zellkultur über die Zeit sollte mit einer Angleichung der RNA-Verteilung und einer schrittweisen Reversion der im Kodongebrauch veränderten Sequenz hin zum Wildtyp führen.

Für diese Replikationsstudie wurden MT4-Zellen mit HXsynCla-Spe, HXsynNsp-Spe, HXsynSpe-Apa, HX10 (als Positivkontrolle), HXsyn oder pcDNA (als Negativkontrolle) transfiziert und über einen Zeitraum von drei Monaten kultiviert. Dabei wurde in der Regel

alle 14 Tage die Lebendzellzahl durch Zugabe neuer Zellen auf  $7,5 \times 10^6$  eingestellt. Für die Analyse des p24-Capsid-Antigens mit dem p24 *Capture Assay*-ELISA wurde alle zwei bis drei Wochen Zellkulturüberstand abgenommen. Gleichzeitig wurde pro Konstrukt ein Aliquot an Zellen zur späteren Isolierung der genomischen DNA eingefroren. Infizierte Zellen tragen die HIV-Provirus-DNA integriert in ihrem Genom. Deshalb kann eine Analyse dieser DNA dazu dienen, etwaige Mutationen im HIV-Provirus aufzufinden.

Die Gewinnung der genomischen DNA erfolgte durch den *QIAamp DNA* Kit (QIAGEN, Düren) nach Angaben des Herstellers. Mittels PCR wurde daraus das provirale *gag*-Gen amplifiziert (Primersequenz siehe Material). Der *forward*-Primer lag dabei vor der *Cla* I- (innerhalb des UTR Bereiches), der *revers*-Primer hinter der *Bcl* I-Restriktionsstelle, wobei bekannt ist, dass beide Schnittstellen singular im HIV-Provirus vorliegen und die *gag*-Sequenz einschließen. Damit konnte die amplifizierte DNA nach Verdau mit diesen Enzymen über die entstandenen *sticky ends* in den - mit demselben Enzymen geschnittenen - pIn8p55Δ4 Vektor ligiert werden. Zuletzt wurde das geschaffene Plasmid in GM2163 Bakterien transformiert. Daraus isolierte DNA wurde schließlich zum Sequenzieren gegeben.

Um ein extrem verzögertes Replikationsverhalten bei den Proviren „*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsyn*“ ausschließen zu können, welches durch die Versuchsdurchführung des sogenannten „Kurzzeit“-Versuches (48-stündiges Splitten der Zellen und damit Ausverdünnung des Virusüberstandes) nicht zu detektieren gewesen wäre, wurden im sogenannten „Langzeit“-Versuch in regelmäßigen Abständen die p24-Konzentrationen aus dem Zellkulturüberstand bestimmt. p24 war dabei bei keinem dieser Proviren zu irgendeinem Zeitpunkt zu detektieren. Dies ist jetzt allerdings im Widerspruch zur Titrationsanalyse. Eine mögliche Erklärung wäre die Eigenschaft der MT4-Zellen, die sich zwar leichter als die CEM-Zellen infizieren, dafür im Gegensatz zu diesen schwerer transfizieren lassen (Erfahrungswert unserer Arbeitsgruppe). Es wurde zwar versucht, sowohl den „Kurzzeit“- als auch „Langzeit“-Versuch mit beiden Zelllinien durchzuführen, - das Problem dabei war allerdings, dass abwechselnd die MT4- oder die CEM-Zellen nicht - für Versuchszwecke optimal - zu kultivieren waren. Deshalb wurde das Replikationsverhalten nur in CEM-Zellen analysiert, während die „Langzeit“-Studie nur in MT4-Zellen durchgeführt wurde.

Da nur aus den Versuchsansätze mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* transfizierten Zellen p24 nachzuweisen war, wurde nur aus diesen Zellen genomische DNA isoliert und wie beschrieben analysiert.

Für die Zeitpunkte zwei, drei, fünf, acht und zehn Wochen nach Transfektion wurden jeweils zehn Klone zum Sequenzieren gegeben. Die unterschiedliche Anzahl an den Gesamtsequenzierungen ergab sich daraus, dass nicht alle Sequenzen auswertbar waren. Die Mutationsrate (berechnet wie im Paper von O'Neil *et al.*, 2002) bezieht sich auf die Mutationen im analysierten Sequenzbereich zwischen der Restriktionsschnittstellen *Spe* I und *Apa* I (503 bp) und der Gesamtbasenpaaranzahl (503 bp x Anzahl der ausgewerteten Klone) (siehe Abbildungen D.-37. bis D.-41.).

Analyse der Sequenz zwischen <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	<i>HXsynSpe-Apa</i>	<i>HX10</i>
Anzahl der analysierten Sequenzen	5	10
Gesamtzahl der Klone ohne Mutationen	3	6
Gesamtzahl der Klone mit Mutationen	2	4
eine Mutation pro Klon	2	3
zwei Mutationen pro Klon	-	1
Punktmutationen	2	3
Deletionen	-	2 (jeweils von A)
Reversion zur Wildtyp-Sequenz	0	
A → G	-	2
C → T	1	-
T → C	-	1
T → A	1	-
Mutationsrate im Bereich von <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	$7.952 \times 10^{-4}$	$9.94 \times 10^{-4}$

**Tabelle D.-37. Gesamtübersicht über die Mutationen, -typen und -rate nach zweiwöchiger Kultivierung.**

Analyse der Sequenz zwischen <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	<i>HXsynSpe-Apa</i>	<i>HX10</i>
Anzahl der analysierten Sequenzen	7	10
Gesamtzahl der Klone ohne Mutationen	6	8
Gesamtzahl der Klone mit Mutationen	1	2
eine Mutation pro Klon	1	-
zwei Mutationen pro Klon	-	2
Punktmutationen	1	3
Deletionen	-	1 (von C)
Reversion zur Wildtyp-Sequenz	0	
A → G	-	1
G → A	-	2
C → T	1	-
Mutationsrate im Bereich von <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	$2.84 \times 10^{-4}$	$7.952 \times 10^{-4}$

**Tabelle D.-38. Gesamtübersicht über die Mutationen, -typen und -rate nach dreiwöchiger Kultivierung.**

Zwei und drei Wochen nach Transfektion konnte in der Sequenz von *HXsynSpe-Apa* noch keine Reversionsmutation zum Wildtyp analysiert werden. Der hierbei beobachtete große Differenz bei der Mutationsrate vom *HXsynSpe-Apa*-Provirus ist auf die unterschiedliche Anzahl der untersuchten Klone mit Basenpaaraustausche zurückzuführen.

Analyse der Sequenz zwischen <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	<i>HXsynSpe-Apa</i>	<i>HX10</i>
Anzahl der analysierten Sequenzen	8	7
Gesamtzahl der Klone ohne Mutationen	5	6
Gesamtzahl der Klone mit Mutationen	3	1
eine Mutation pro Klon	3	1
Punktmutationen	3	1
Reversion zur Wildtyp-Sequenz (G → A (Position 1222))	1	
A → G	-	1
G → A	2	-
T → C	1	-
Mutationsrate im Bereich von <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	$7,455 \times 10^{-4}$	$2,84 \times 10^{-4}$

**Tabelle D.-39. Gesamtübersicht über die Mutationen, -typen und -rate nach fünfwöchiger Kultivierung.**

Analyse der Sequenz zwischen <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	<i>HXsynSpe-Apa</i>	<i>HX10</i>
Anzahl der analysierten Sequenzen	8	8
Gesamtzahl der Klone ohne Mutationen	7	7
Gesamtzahl der Klone mit Mutationen	1	1
eine Mutation pro Klon	1	1
Punktmutationen	1	1
Reversion zur Wildtyp-Sequenz	0	
C → T	1	-
T → G	-	1
Mutationsrate im Bereich von <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	$2,485 \times 10^{-4}$	$2,485 \times 10^{-4}$

**Tabelle D.-40. Gesamtübersicht über die Mutationen, -typen und -rate nach achtwöchiger Kultivierung.**

Analyse der Sequenz zwischen <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	<i>HXsynSpe-Apa</i>	<i>HX10</i>
Anzahl der analysierten Sequenzen	7	8
Gesamtzahl der Klone ohne Mutationen	4	3
Gesamtzahl der Klone mit Mutationen	3	5
eine Mutation pro Klon	3	5
Punktmutationen	3	5
Reversion zur Wildtyp-Sequenz (C → T (Position 1020))	1	
A → G	1	4
G → A	1	1
C → T	1	-
Mutationsrate im Bereich von <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	$8,52 \times 10^{-4}$	$12,425 \times 10^{-4}$

**Tabelle D.-41. Gesamtübersicht über die Mutationen, -typen und -rate nach zehnwöchiger Kultivierung.**



Zum Zeitpunkt von fünf und zehn Wochen nach Transfektion konnte die erste Reversion in *HXsynSpe-Apa* zur Wildtyp-Sequenz analysiert werden. Dies wurde zum einen durch eine C → T bzw. G → A Mutation erreicht. Der teilweise große Unterschied zwischen den Mutationsraten innerhalb der Proviren „*HXsynSpe-Apa*“ und „*HX10*“ muss auf die geringe Anzahl (max. zehn) der ausgewerteten Sequenzen zurückgeführt werden.

Für beide Versuchsansätze wurden deshalb nach dreimonatiger Kultivierung jeweils 90 Klone zum Sequenzieren gegeben, um eine statistische Absicherung der Daten zu gewährleisten. Dabei konnten für den Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ 85 und für den Wildtyp „*HX10*“ 84 Sequenzen analysiert werden, - die restlichen Sequenzierungen waren zu schlecht, um ausgewertet werden zu können.

Analyse der Sequenz zwischen <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	<i>HXsynSpe-Apa</i>	<i>HX10</i>
Anzahl der analysierten Sequenzen	85	84
Gesamtzahl der Klone ohne Mutationen	52	61
Gesamtzahl der Klone mit Mutationen	33	23
eine Mutation pro Klon	27	17
zwei Mutationen pro Klon	5	5
drei Mutationen pro Klon	1	1
Punktmutationen	37	30
Insertionen	2 (jeweils von C)	-
Deletionen	1 (von G)	-
Reversion zur Wildtyp-Sequenz (immer über C → T)	4	
A → G	11	10
G → A	9	12
C → T	10	-
T → C	6	7
A → T	1	-
A → C	-	1
Mutationsrate im Bereich von <i>Spe</i> I und <i>Apa</i> I	$9,355 \times 10^{-4}$	$7,1 \times 10^{-4}$

**Tabelle D.-42. Gesamtübersicht über die Mutationen, -typen und -rate nach zwölfwöchiger Kultivierung.** Die Mutationsrate präsentiert die Anzahl der Mutationen pro analysierten Abschnitt. Damit wurde die Mutationsrate wie folgt berechnet:  $\text{Mutationsrate} = \text{Gesamtzahl der Mutationen} / \text{Gesamtzahl der Basenpaare}$  (503 bp x analysierte Klone). *HXsynSpe-Apa*:  $40 / 42755 = 9,355 \times 10^{-4}$ ; *HX10*:  $30 / 42252 = 7,1 \times 10^{-4}$ .

Beim Versuchsansatz mit dem Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ zeigten nahezu 61% der Klone keine Mutationen auf, bei der Studie mit dem Wildtyp-Provirus waren es annähernd 73%. Bemerkenswert ist hierbei, dass die unterschiedliche Anzahl der Klone mit Mutationen (*HXsynSpe-Apa*:33; *HX10*: 23) wohl auf die zehn C → T Austausche innerhalb der *HXsynSpe-Apa*-Sequenz zurückzuführen sind. Aufgrund der hohen intrazellulären Konzentration an dTTP im Zellkern und der hohen Fehlerrate der Reversen Transkriptase wird die Transversion von C nach T gefördert (Vartanian *et al.* 1994). Diese führten in 40% der Fälle zur Wildtyp-Sequenz. Allerdings konnte hier keine manifestierte Reversion beobachtet werden (C → T-Austausch an Position 870, 1020, 1022, 1185 innerhalb von BH10). Der C

→ T Austausch an Stelle 1020 trat zwar zwei Wochen vorher bereits auf, allerdings war er bei den zehn C → T Mutationen nur einmal vertreten. Darüber hinaus hat der chimäre Provirus eine Mutationsrate, die annähernd dem Literaturwert entspricht ( $9,2 \times 10^{-4}$ ; O'Neil *et al.*, 2002). Insofern kann man sagen, dass dieses Konstrukt keinem Selektionsdruck unterliegt.

#### **D.4.5. Zusammenfassung**

In diesem letzten Teilabschnitt der Doktorarbeit wurden in Analogie zu den unter D.2.1.1. vorgestellten chimären *gag*-Konstrukten drei chimäre Proviren erzeugt, um den Einfluss der Sequenz auf die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen der Replikation von HIV austesten zu können. Dabei wurden bestimmte Sequenzbereiche innerhalb von *gag* an die Kodonwahl von hochexpremierenden Säugetiergenen angepaßt.

Die Analyse der p24-Expression zeigte bei den chimären Proviren, deren 5'-Ende von *gag* kodonoptimiert ist („*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsyn*“ als „*gagpol*-synthetischer“ Provirus), eine drastische Reduzierung der p24-Produktion. Die Detektion von Pr55<sup>gag</sup> und seiner Derivate im Western Blot deutet dabei auf eine fehlerhafte Gag-Prozessierung hin, wobei die Prozessierung des nach Transfektion mit *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* gebildeten Gag-Proteins in gleicher Weise zu verlaufen scheint. Der Nachweis von Env gelingt für die chimären Proviren nur nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* und *HXsynSpe-Apa*, bei denen ebenfalls mindestens 30% der Wildtyp (*HX10*) p24-Sekretion detektierbar war. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach Transfektion mit *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* die Konzentration an produzierten Env bereits unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Reverse Transkriptase ist wie Env nur aus mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynSpe-Apa* und *HX10* transfizierten Zellen detektierbar.

Betrachtet man die RNA-Verteilung der chimären Viren, so liegt diese nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* im Zytoplasma eindeutig auf der Seite der einfach gespleißten RNAs (ca. 4 kb), nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* dagegen ist das Verhältnis zwischen ungespleißter und einfach gespleißter zytoplasmatischer viraler RNA zunehmend ausgeglichener bzw. liegt ganz auf der Seite der ungespleißten RNA (bei *HXsyn*-transfizierten Zellen). Gleichzeitig zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Effektivität des RNA-Transportes. Damit sind die Differenzen der chimären Proviren in ihrer Proteinexpression auf RNA-Ebene zurückzuführen. Inwieweit Kern-Degradierung, schlechte Transkription, ineffektiver Export oder desolate Translation der RNA dafür verantwortlich sind, steht zur Diskussion.

Bei der Infektion von „*MAGF*“-Zellen mit Kulturüberstand nach transients Transfektion von H1299-Zellen führten nur die Viren, die nach Transfektion der Zellen mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* gebildet wurden, zu einer Blaufärbung der Indikatorzellen. Bei der Analyse des Virustiters mit CEM-Zellen waren dagegen alle Proviren - wenn auch mit unterschiedlichem Titer - infektiös. Hier kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass sezerniertes p24 von H1299-Zellen teilweise mitnachgewiesen wurde. Eine andere Möglichkeit, diesen Unterschied bei den Ergebnissen zu erklären, ist der Einsatz

unterschiedlicher Zelllinien. Desweiteren wurden die Lymphozyten länger mit dem Kulturüberstand inkubiert und lagen in einer höheren Zellzahl vor.

Zuletzt wurde schließlich noch das Replikationsverhalten in einem „Kurzzeit“- bzw. einem „Langzeit“-Versuch analysiert. Ersterer diente dazu die Replikationskinetik im Vergleich zum Wildtyp zu betrachten. Zweiterer diente der Beobachtung etwaiger Rückmutationen mit der Zeit. Dabei konnte nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* zu keinem Zeitpunkt p24 im Zellkulturüberstand detektiert werden. Der chimäre Provirus *HXsynSpe-Apa* zeigt gegenüber dem Wildtyp *HX10* eine leicht verzögerte Replikation mit ebenfalls reduzierten p24-Maximalwerten. Die Analyse des integrierten HIV-Genoms ergab nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* nach drei Monaten für den chimären *gag*-Bereich ein relativ ausgeglichenes Verhältnis zwischen Pyrimidin- (16) und Purinaustausche (22), während der Wildtyp vor allem auf Purin-Ebene (22; - Pyrimidinaustausche: 7) mutiert. Manifestierte Reversionen zum Wildtyp konnte nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* nicht beobachtet werden. Interessant ist, dass die C → T Austausche nur in der *gag*-Sequenz von *HXsynSpe-Apa* aufgetreten ist, wodurch zu 40% eine Reversion stattfand. Eine manifestierte Rückmutation zur Wildtyp-Sequenz konnte allerdings nicht beobachtet werden. Insgesamt muß zudem betont werden, dass die meisten Sequenzanalysen bei beiden Proviren überhaupt keine Mutationen aufzeigten.

## E. Diskussion

### E.1. Bedeutung des Kodongebrauchs für die Genexpression und den nukleären Export von chimären *gag*-Konstrukten bzw. ihrer nach Transfektion gebildeten RNA (unter und ohne Einfluss *cis*- und *trans*-aktiver HI-viraler Elemente)

#### E. 1.1. Bedeutung der 5'-Hälfte von *wtgag* für die Genexpression

Ausgehend von den Plasmiden *wtgag* und *syngag* wurden chimäre *gag*-Konstrukte entworfen, die in unterschiedlicher Zusammensetzung Wildtyp- und synthetische *gag*-Sequenzen und damit auch jeweils einen divergierenden Anteil der postulierten inhibitorischen Sequenzen (INS) beinhalten. Anhand dieser Konstrukte konnte gezeigt werden, dass die 5'-Hälfte des *gag*-Gens für die niedrige Pr55<sup>gag</sup>-Expression mit *wtgag* transfizierten Zellen verantwortlich ist. Aufgrund der Expressionsunterschiede nach Transfektion mit *chl* (sehr gute Expression), *chl-2* (gute Expression) und *chl-3* (sehr schlechte Expression) wird davon ausgegangen, dass die hierbei zunehmende Pr55<sup>gag</sup>-Repression auf einen additiven inhibitorischen Effekt innerhalb der *wtgag*-Sequenz zurückzuführen ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Stabilität der *gag*-RNA-Sekundärstruktur einen Einfluss auf die Pr55<sup>gag</sup>-Expression hat. Dies kann allerdings nicht mit dem zugrundeliegenden A/U-Gehalt der *gag*-Konstrukte erklärt werden. Einen ähnlichen Befund erhielt Collier 2002 bei HPV (*Human Papillomavirus*). Er konnte ebenfalls zeigen, dass die 5'-Hälfte (514 nt) des L1 (Capsidprotein)-Gens von HPV-16 starke inhibitorische Sequenzelemente beinhaltet, ohne ein bestimmtes Sequenzmotiv dafür verantwortlich machen zu können. Er weist jedoch darauf hin, dass das 5'-Ende (129 nt) von L1 in einen Pyrimidin-reichen 5'- und in einen A/U-reichen 3'-Abschnitt geteilt werden kann (Collier *et al.*, 2002). Daneben scheinen die INS Elemente von HPV-16, wie die von HIV-1, keinen Einfluss auf die Translationseffizienz zu haben.

Zudem ist noch nicht erklärt, warum die Gag-Sekretion mit *chl-2* transfizierten Zellen gegenüber ihrer Expression um mehr als 60% sinkt. In diesem Punkt weichen sie von den Transfektionen mit den anderen chimären Konstrukten ab, die nur eine Erniedrigung von 20 bis 30% zeigten.

#### E. 1.2. Detektion von Sequenzmotiven für RNA-bindende Proteine innerhalb von *wtgag*

##### „A/U-rich elements (ARE)“

Da die bisherigen Ergebnisse der *gag*-Expressionen darauf hingewiesen haben, dass im 5'-Anteil des *wtgag*-Gens die Ursache für die schlechte Pr55<sup>gag</sup>-Expression liegen muß, wurde die *wtgag*-Sequenz (anhand selbstgeschriebenen Dateien) Computeranalysen unterworfen, um darin etwaige Besonderheiten aufzudecken. Dabei wurde berücksichtigt, dass das von Schwartz beschriebene INS-1 Element sich innerhalb des ersten Fragmentes von *wtgag* befindet und die von Schneider dargestellte INS-2 Sequenz über dem dritten und vierten Fragment liegt (Schwartz *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1997). Für INS-1 konnte ein

UAAAU-Motiv entdeckt werden, das komplementär zu dem bekannten RNA-Bindemotiv ARE (*A/U-rich elements*; 5'-AUUUA-3') ist.

AREs wurden als RNA-Destabilisierungselemente im untranslatierten 3'-Bereich vieler zellulärer mRNAs gefunden, die vor allem für Proto-Onkogene, für nukleäre Transkriptionsfaktoren oder Cytokine (z.B. c-myc, c-fos, c-myc, IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-3) kodieren (Hentze, 1991). Shaw konnte bereits 1986 zeigen, dass AUUUA-Motive, die Ursache für die schnelle Degradation zellulärer GM-CSF-mRNAs sind (Shaw *et al.*, 1986). Chen und Shyu nehmen an, dass kurzlebige RNA über eine einleitende Deadenylierung - sowohl unter dem Einfluss ARE(*adenylate/uridylate-rich element*)-bindender Proteine, als auch dem mRNP(*messenger ribonucleoprotein*)-Komplex - Exo- oder Endonukleasen zugänglich gemacht wird (Chen *et al.*, 1995).

Ferner beinhaltet INS-2 - neben den von Schneider genannten zwei AUUUA-Motiven - die Sequenz 5'-AUUAAAUAA-3'. Als RNA-Bindemotiv für ARE-bindende Proteine wurden auch die Sequenzen 5'-UUAUUUA(A/U)(A/U)-3' genannt (Lagnado *et al.*, 1994). Auffällig ist, dass das in INS-2 liegende Motiv zu dieser bekannten 3'-5'-Sequenz komplementär ist. Allerdings ist in der Literatur weder bekannt, dass die neu entdeckten Sequenzen eine inhibitorische Eigenschaft aufweisen, noch, dass die bekannten AREs-RNA-Bindemotive auch komplementär und/oder orientierungsunabhängig wirken können.

Ein Problem für die Regulation der Replikation von HIV-1 ist, dass die zelluläre Genexpression ein extensives Netzwerk darstellt. Transkription (Initiation, Elongation, Termination), RNA Prozessierung (5'-Capping, Spleißen, 3'-Poly-Adenylierung), mRNA Export und RNA-„Surveillance“ (*nonsense-mediated decay* (NMD), RNA-Degradierung) sind derart miteinander gekoppelt, dass mehrere Faktoren unterschiedliche Rollen bei der Genexpression spielen können und müssen (zum Überblick: Maniatis & Reed, 2002).

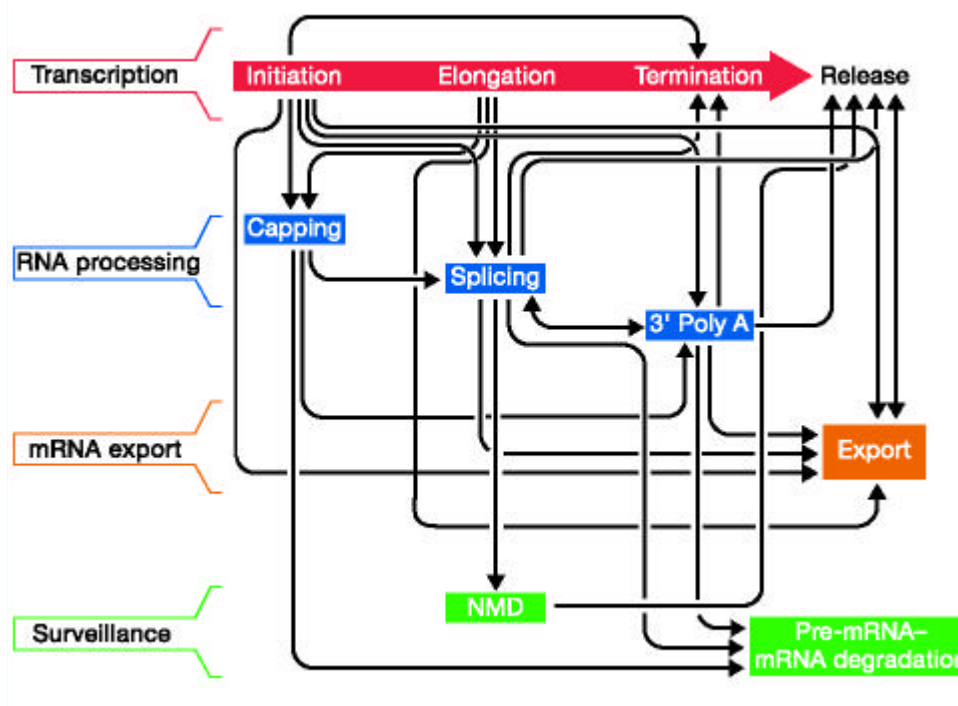


Abbildung E.-2. Überblick über das Netzwerk der gekoppelten Interaktionen während der Genexpression (verändert nach Maniatis & Reed, 2002).

### „Spleißen und daran beteiligte cis- und trans-aktive Elemente“

Bereits 1998 vermutete Stefan Schwartz, dass zelluläre *trans*-aktive Faktoren für die inhibitorische Wirkung der INS Elemente notwendig sind. Durch die frühzeitige Erkennung und Bindung von Rev an die RRE-haltige RNA während der Transkription, werden bestimmte Schritte des RNA-Prozessierungsweges umgangen, so dass die obligate Interaktion der inhibitorischen Sequenzmotive mit den unbekannten, zellulären, *trans*-wirkenden Faktoren unterbunden wird (Schwartz, 1998). Berücksichtigt man zum einen das zelluläre Regulationsgeflecht der Genexpression, so liegt es nahe, dass Rev nicht nur als Exportfaktor für die RRE-haltige HI-virale RNA fungiert. Zum anderen weist das Modell von Schwartz darauf hin, dass für die retrovirale Expressionskontrolle auch zelluläre Faktoren wichtig sind. Die frühe Bindung von Rev an die frisch transkribierte RRE-haltige RNA und die Notwendigkeit der Anwesenheit von UTR, der den 5'-Spleißdonor beinhaltet, für die Rev-abhängige Genexpression deuten hierbei auf eine Interaktion mit der Spleißmaschinerie und somit mit Spleißfaktoren hin (Chang *et al.*, 1989, Hammarskjold *et al.*, 1989, Kjems *et al.*, 1991). Deshalb wurde die *gag*-RNA auch auf Bindestellen für Faktoren hin untersucht, die a) bei der Regulation des Spleißprozesses beteiligt sind, da Rev für den Export un- und einfach gespleißter RNA benötigt wird, und b) obligat für das Spleißen und daran gekoppelte Prozesse sind.

### „Regulierende Spleißfaktoren“

An Position 1301 im Leserahmen von *wtgag* befindet sich die hnRNP A1-Bindestelle (5'-UAGGGA-3') (Motiv zitiert in Najera *et al.*, 1999), die innerhalb von *syngag* nicht vorkommt.

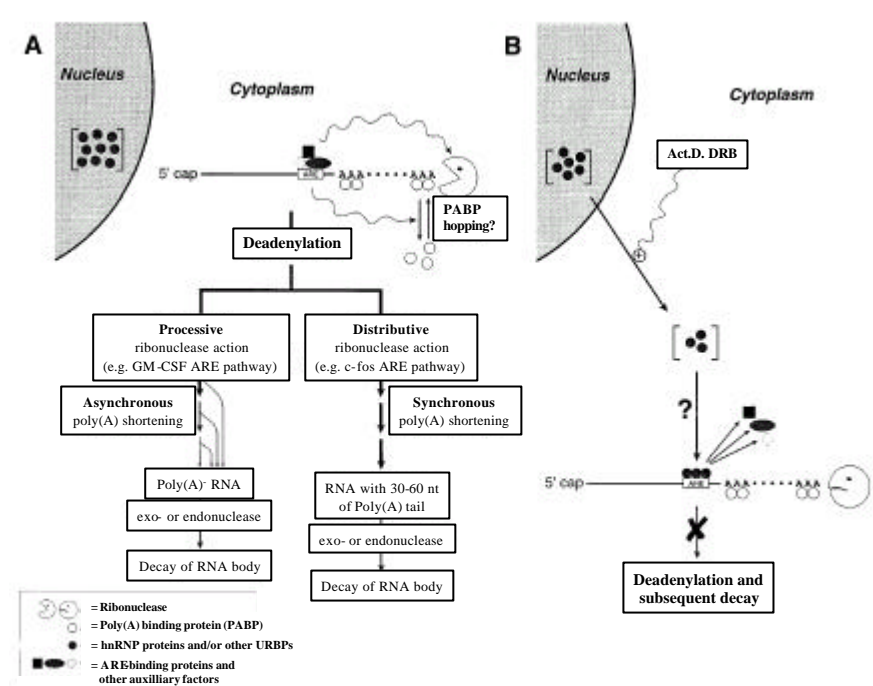
HnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) sind nukleäre RNA-bindende Proteine, die die Transkripte der RNA-Polymerase II komplexieren. Sie sind in zahlreiche regulatorischen Prozesse während der Genexpression involviert, und einige von ihnen können zwischen Kern und Zytoplasma shuttle. Zu der sogenannten großen („major“) Gruppe der hnRNPs gehört hnRNP A1. hnRNP A1 wird im Kern eine Funktion beim Spleißen (als Exon Repressor, indem es an ESS(*exonic splicing silencer*) bindet) und beim mRNA-Transport zugesprochen. hnRNP A1 fungiert als Antagonist zu den SR-Proteinen, indem es deren Exon-Erkennung durch Bindung an ESS blockiert. Nach einer initialen Bindung an die erforderliche ESS-Sequenz werden weitere hnRNP A1 an die „stromaufwärts“ liegende Exonregion heran rekrutiert. Die zu den SR-Proteinen gehörenden Spleißfaktoren SC35 und SF2/ASF erkennen beide stromaufwärts orientierte ESE(*exonic splicing enhancer*)-Sequenzen, aber nur SF2/ASF kann die zusätzliche Bindung weiterer hnRNP A1 blockieren und damit die Inhibition des Spleißens durch hnRNP A1 aufheben (zum Überblick: Zhu *et al.*, 2001). Desweiteren konnte Hamilton 1997 nachweisen, dass hnRNP A1 im Zytoplasma an das Sequenzmotiv 5'-AUUUA-3' (ARE) *in vivo* bindet und so die RNA stabilisiert. Allerdings beeinflusst zum einen die RNA-Sekundärstruktur diese RNA-Protein-Interaktion, zum anderen hängt die RNA-bindende Aktivität von hnRNP A1 von ihrer zellulären Lokalisierung ab. Der Aufenthaltsort von hnRNP A1 wird dabei durch die unterschiedliche Phosphorylierungen (Serin, Threonin) des Proteins bestimmt. Da die Nukleinsäuresequenz die RNA-Sekundärstruktur beeinflusst, ist somit auch der Kontext des ARE-Motivs für den sog. „RNA-Turnover“ bedeutend (zum Überblick: Hamilton *et al.*, 1997 bzw. zum Überblick über hnRNPs: Krecic und Swanson, 1999).

Berücksichtigt man die Exon-Repressor-Funktion von hnRNP A1, so zeigen die Ergebnisse, dass das RNA-Bindemotiv für hnRNP A1 in *wtgag* keinen Einfluss auf die Expression der *chgag*-Plasmide hat. Es befindet sich an Position 1301 innerhalb von *wtgag* (Dieses Element begrenzt das fünfte Fragment am 3'-Ende.) und ist deshalb nur in den Konstrukten *ch5*, *ch4-5*, *ch4-6*, *ch5-6* und *ch1-5* vorhanden. Bislang konnte aber gezeigt werden, dass die 5'-Hälfte von *wtgag* für die Rev-abhängige Regulation der Gag-Expression entscheidend ist. Deshalb dürfte die hnRNP A1-Bindestelle keine Funktion bei der zeitlich regulierten HI-viralen Genexpression übernehmen. Es befindet sich zwar im kodogenen DNA-Strang für *wtgag* an Position 427 nochmals eine hnRNP A1-Bindestelle (5'-UAGGGU-3') (Motiv zitiert in Najera *et al.*, 1999.), die allerdings 3'-5' orientiert ist. Wie bei den bereits genannten, neu entdeckten A/U-reichen Sequenzmotiven konnten auch hier in der Literatur keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die hnRNP A1-RNA-Bindestellen komplementär und/oder orientierungsunabhängig wirken können. Deshalb ist diesem zweiten Motiv für hnRNP A1 ebenfalls keine Bedeutung zuzusprechen.

Beachtet man weiter die Fähigkeit von hnRNP A1, im Zytoplasma an ARE binden zu können, und berücksichtigt ferner das vorgeschlagene Modell über die RNA-Degradierung anhand der ARE-Motive, welches bislang nur für das Zytoplasma diskutiert wird (zum besseren Überblick siehe Abbildung E.-3.), so können zwei Feststellungen getroffen werden:

1. Der postulierte unbekannte zelluläre Faktor, der bei der Rev-abhängigen Expression beteiligt ist, kann nicht hnRNP A1 sein, da dieses Protein an ARE nur im Zytoplasma bindet und seine eigentliche RNA-Bindestelle in *wtgag* an Position 1301 liegt.
2. Für die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen der HIV-Replikation kann nicht das klassische Modell der ARE-vermittelten Degradierung der RNA verantwortlich sein, da die RNA-destabilisierende Wirkung der ARE erst im Zytoplasma zum Tragen kommt, der Abbau der *wtgag*-RNA aber bereits im Kern stattfindet.

(Ein Aspekt ist aber interessant: Schneider grenzte in seiner Studie von 1997 die Lokalisierung der INS Elemente anhand von *gag*-Konstrukten mit unterschiedlichen Kombinationen über Punktmutationen ein (Schneider *et al.* 1997). Berücksichtigt man die Positionen dieser Sequenzaustausche und der eben genannten A/U-reichen Motive innerhalb von *wtgag*, so kann man feststellen, dass dadurch alle Bindestellen für ARE-bindende Proteine zerstört wurden.)



**Abbildung E.-3. A: Modell der ARE-vermittelten mRNA-Degradierung anhand zweier distinkter Deadenylierungsmechanismen für GM-CSF und c-fos. B: Einfluss von ActD und DRB (beide Inhibitoren der Transkription) auf die Destabilisierungsfunktion der AREs.** *GM-CSF* = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; *ActD* = actinomycin D; *DRB* = 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-benzimidazole (verändert nach Chen et al., 1995).

Deshalb wurde die *gag*-RNA auf weitere Bindestellen für Faktoren hin untersucht, die - wie bereits erwähnt - a) bei der Regulation des Spleißprozesses beteiligt und b) obligat für das Spleißen und daran gekoppelte Prozesse sind.

### „Obligate Spleißfaktoren“

Bei dieser Analyse konnten für ASF/SF2 (5′-RGAAGAAC-3′ bzw. 5′-SRSASGA-3′) und SC35 (5′-UGCNGYY-3′ bzw. 5′-AGCAG-3′) die jeweils in Klammern angegebenen RNA-Sequenzmotive detektiert werden (**N**: A/U/C/G; **R**: A/G; **Y**: U/C; **S**: G/C) (Motive zitiert in Liu et al., 1998, Tacke & Manley, 1999 bzw. Graveley, 2000.). Die Bindestellen für ASF/SF2 liegen dabei an Position 208, 217, 363 und 930, die für SC35 an Position 111, 350, 353, 370, 548, 707, 1350, 1386 und 1459 und sind 3′-5′ orientiert, sowie komplementär an Position 357, 630 und 1047 innerhalb der *wtgag*-Sequenz lokalisiert. Ein Einfluss beider Faktoren auf die HIV-Regulation wird, wie bereits erwähnt, in der Literatur immer wieder diskutiert.

Beide Spleißfaktoren gehören zur Familie der SR-Proteine. Die SR-Proteine besitzen ein oder zwei Amino-terminal gelegene RNA-bindende Domänen und eine in der Regel Carboxy-terminal lokalisierte RS-Domäne, die aus einer jeweils unterschiedlichen Anzahl von Arginin-Serin-Dipeptid-Wiederholungen besteht. Es handelt sich um eine Klasse sequenzspezifischer RNA-Bindeproteine mit jeweils unterschiedlichen RNA-Spezifitäten. Die Protein-Protein-Interaktion der SR-Proteine findet vermutlich über ihre RS-Domäne statt. Desweiteren werden die SR-Proteine über ihre RS-Domäne in die im Kern lokalisierten „Speckles“ dirigiert. Dabei hängt die Aktivität der RS-Domäne direkt von der Anzahl der vorhandenen Arginin- und Serin-Reste ab (zum Überblick: Tacke und Manley, 1999).



Die SR-Proteine sind essentielle Spleißfaktoren und können konzentrationsabhängig die Auswahl alternativer Spleißstellen regulieren, - teilweise auch dadurch, dass sie die Aktivität von hnRNP A1 antagonistisch unterbinden. Sie agieren sehr früh beim Ausbilden des Spleißosoms und haben unterschiedliche Aufgaben beim konstitutiven und alternativen Spleißen. Eine dieser Rollen ist das Erkennen von „*exonic splicing enhancer*“ (ESE) Elementen. Diese Sequenzmotive stellen in höheren Eukaryonten ein effizientes und genaues Spleißen der prä-mRNA sicher, welches einer präzisen Erkennung der Intron-Exon-Grenzen durch das Spleißosom bedarf. Die ESE bestehen aus degenerierten Sequenzmotiven. Dadurch können sie von verschiedenen SR Proteinen anhand überlappender Bindestellen mit unterschiedlichen Affinitäten erkannt werden. Dies ist eine wichtige Eigenschaft der ESE Elemente, da ihre Funktion dadurch reguliert werden kann. Darüber hinaus wird vermutet, dass ESE-bindende SR-Proteine U2AF und U1 snRNP an die Spleißstellen von Exons mit schwachen Spleißmotiven heranführen (zum Überblick: Liu *et al.*, 1998, Hastings *et al.*, 2001, Caputi *et al.*, 2002).

1997 zeigte Powoll, dass eine Überexpression von SF2/ASF die Rev-Funktion und die virale Replikation über die Bindung an RRE inhibieren kann (Powoll *et al.*, 1997). Es wurde vermutet, dass die Interaktion von Rev mit verschiedenen Spleißproteinen in der „natürlichen“ Umgebung die notwendige Entfernung der Spleißfaktoren von Intron-haltiger RNA vermittelt. Pongoski konnte fünf Jahre später darstellen, dass eine erhöhte Konzentration an SF2/ASF und SC35 zelltypabhängig einen Einfluss auf das Verhältnis ungespleißter zu einfach gespleißter viraler RNA haben kann (Pongoski *et al.*, 2002). Dabei zeigten beide SR-Proteine keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von Rev und seiner Fähigkeit zu „*shutteln*“. Allerdings konnte SC35 den Rev-vermittelten RNA-Export inhibieren.

Eine Aussage darüber, welchen regulierenden Einfluss die SF2/ASF- und SC35-Bindestellen bei der Expression der chimären *gag*-Plasmide haben, kann, unter Berücksichtigung der Computeranalysen für die einzelnen Konstrukte, nicht getroffen werden. Durch die Chimerisierung werden nicht nur diese Motive zerstört, sondern auch wieder an anderer Stelle neu kreiert. Schneider hat 1997 mit *gag*-Plasmiden gearbeitet, die einzelne Punktmutationen enthielten, um die Lokalisierung der INS Elemente eingrenzen zu können. Vergleicht man diese Stellen mit den gefundenen Bindemotiven für SF2/ASF und SC3, so stellt man fest, dass er dabei kein einziges der vorgestellten Motive für die Spleißfaktoren in *wtgag* zerstört hat (Schneider *et al.*, 1997). Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Bindestellen von SF2/ASF und SC35 in der *wtgag*-RNA nicht auf die Rev-abhängige Expression von *wtgag* auswirken.

„*ESE (exon splicing enhancer) und ESS (exon splicing silencer)*“

Pongoski zeigte 2002, dass der Einfluss der SR-Proteine auf die Rev-Funktion nicht auf einer Interaktion mit den ESE Elementen beruht (Pongoski *et al.*, 2002). Er vermutete, dass sie über Bindung an anderen RNA Regionen fungieren. Er konnte zeigen, dass die Deletion der ESE- und / oder ESS-Motive in der viralen RNA einen signifikanten Einfluss auf die Rev-Funktion hat. Das Entfernen der ESE Elemente verhinderte das Spleißen der viralen RNA. Darüber hinaus war auch der Rev-abhängige RNA-Export blockiert, was nicht nur auf der Inhibition des Spleißens beruht. Wurden hnRNP A1-Bindestellen in die RNA eingefügt, so wurde das Spleißen der RNA gleichermaßen gehemmt, ohne jedoch einen Einfluss auf den Export zu haben. Desweiteren konnte er zeigen, dass eine Deletion

der ESS-Motive keinen Einfluss auf die Spleißrate hat. Hieraus schloß Pongoski, dass die Rev-Abhängigkeit auf die Anzahl und Art der Faktoren zurückzuführen ist, die an ESS binden. Er vermutete, dass ESS-bindende Proteine die RNA entweder in einen Komplex einschließen oder einem „Pathway“ zuführen, wodurch sie dem Rev-vermittelten Transport entzogen wird.

Die Anwesenheit von ESS-Motiven im viralen Genom und ihre regulierende Funktion beim Spleißen der HIV-1-RNA ist schon lange bekannt (Amendt *et al.*, 1994, 1995; Staffa *et al.*, 1995). 2001 konnte Bilodeau zeigen, dass das Spleißen der Tat-mRNA über ESS durch Bindung von Mitgliedern der hnRNP A/B-Proteinfamilie reguliert wird. Die Gruppe der hnRNP A/B ist ubiquitär, so dass sie vermutlich für die Repression des Spleißens der HI-viralen RNA in zahlreichen Zelltypen verantwortlich sind (Bilodeau *et al.*, 2001). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass hnRNP A1 nicht nur - wie bereits erläutert - an sein spezifisches RNA-Bindemotiv und an die AR-Elemente („A/U-rich elements“) assoziiert, sondern zusätzlich über ESS mit RNAs interagieren kann.

Aufgrund der degenerierten Sequenzmotive für ESE und ESS ist es schwer, Computeranalysen durchzuführen. Sucht man nach bereits beschriebenen ESE und ESS Elementen, so können eine Vielzahl davon innerhalb von *wtgag* detektiert werden. Durch die Chimerisierung werden nicht nur diese Motive zerstört, sondern auch wieder an anderer Stelle neu geschaffen. Aufgrund der enormen Anzahl kann allein durch Computeranalysen keine Aussage über ihre Funktion getroffen werden. Desweiteren muß berücksichtigt werden, dass die Aktivität von ESE und ESS auch von der RNA-Konformation abhängig ist (Amendt *et al.*, 1995, Muro *et al.*, 1999), was die Datenauswertung weiter erschwert. Außerdem kann nicht mehr ausgeschlossen werden, dass hnRNP A1 bei der Regulation der Expression von *wtgag* eine Rolle spielt. Da hnRNP A1 auch an ESS binden kann, eine Bewertung der Funktion der ESS in *wtgag* aber allein anhand von Computeranalysen nicht machbar ist, ist eine Aussage über eine Interaktion von hnRNP A1 mit den ESS Elementen von *wtgag* nicht möglich.

### Sam68

Innerhalb von *wtgag* konnten vierzehn RNA-Bindestellen (5'-UAAA-3') für Sam68 (Lin *et al.*, 1997) entdeckt werden, die allesamt innerhalb der ersten vier Fragmente von *wtgag* liegen (drei innerhalb von INS-1, zwei zwischen INS-1 und -2 und neun innerhalb von INS-2) und so bisher nicht in dieser Weise in der Literatur genannt sind (Anmerkung: Li *et al.* detektierten diese RNA-Bindestelle für Sam68 bisher innerhalb von HIV nur im Steem-Loop I von RRE (Li *et al.*, 2002).)

Sam68 (68-kDa *Scr-associated substrate during mitosis*) ist ein nukleäres Protein, dass bekannterweise während der Zellzyklusregulation von den c-Src- und Cdc2-Kinasen phosphoryliert wird. Es besteht aus 443 Aminosäuren und beinhaltet zwei RNA-Bindedomänen: eine sogenannte RGG-Box (Arg-Gly-Gly-Motive) und eine KH(hnRNP K homology)-Domäne. Die RGG-Box ist für die RNA-Bindung und Multimerisierung von Sam68 verantwortlich. Während die KH-Domäne sowohl für die Selbst-Assoziation, die RNA-Bindung als auch die zelluläre Lokalisierung von Sam68 essentiell ist (zum Überblick: Reddy, 2000).

Reddy konnte 2000 zeigen, dass Sam68, RHA (*RNA helicase A*) und Tap während der post-transkriptionalen Regulation von HIV-1 miteinander kooperieren (Reddy *et al.*, 2000). Seit mehreren Jahren wird Sam68 eine Funktion beim Export HI-viraler RRE-haltiger

RNA zugesprochen. Das von Li kürzlich vorgestellte Modell weist Sam68 als Transportfaktor aus, welcher den Ran-GTP/Crm-1/Rev/RRE-Komplex über direkte Bindung an die NES von Rev an die Kernpore dirigiert. Dort kommt es zur Interaktion von Crm-1 mit den Nukleoporinen, wodurch der Komplex durch die Kernpore geschleust wird, während Sam68 im Nukleus verbleibt (Li *et al.*, 2002 a).

Da sich dieses Modell auf eine Assoziation von Sam68 mit Rev bezieht, kann es zur Diskussion der Expression der Plasmide *UTR-gag-RRE* mit und ohne Kotransfektion mit pcRev dienen. Innerhalb von *syngag* konnte keine Sam68-RNA-Bindestelle detektiert werden. Vergleicht man die unterschiedlichen Expressionssteigerungen mit *UTR-syngag-RRE* (relativ geringe Steigerung) und *UTR-wtgag-RRE* (sehr hohe Steigerung) transfizierten Zellen nach Kotransfektion mit pcRev, so könnte der Unterschied dadurch erklärt werden, dass sich Sam68 nicht nur an die NES von Rev bindet, sondern auch innerhalb der zu transportierenden RNA. Deshalb erfolgt die Translokalisierung der *UTR-wtgag-RRE*-RNA an die Kernpore hier schneller und effektiver als die *UTR-syngag-RRE*-RNA, denn diese wird trotz der Anwesenheit von UTR und Rev/RRE hauptsächlich nur über den Crm-1 unabhängigen Kernexportweg transportiert. Da alle chimären *UTR-gag-RRE*-Plasmide einen Anteil der in *wtgag* vorkommenden UAAA-Motive haben, könnte ihre gegenüber mit *UTR-syngag-RRE* transfizierten Zellen größere Expressionssteigerung nach Kotransfektion mit pcRev auf eine Interaktion mit Sam68 zurückzuführen sein. Aufgrund der verschiedenen RNA-Enthalpiewerte der chimären *gag*-Konstrukte kann davon ausgegangen werden, dass ihre RNAs unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden. Die Unterschiede in der Expressionserhöhung nach Transfektion mit den chimären *UTR-gag-RRE*-Plasmide könnte man dann dadurch erklären, dass die UAAA-Sequenz innerhalb einer Schleife liegen muß, um von Sam68 erkannt werden zu können, und nicht nur von der absoluten Anzahl der Elemente abhängt (Itoh *et al.*, 2002).

Neueste Studien von Coyle *et al.*, weisen Sam68 allerdings eine andere Rolle zu (Coyle *et al.*, 2003): Sam68 soll nicht den nukleären Export der *gag-pol*-mRNA fördern, sondern für die effiziente Translation dieser RNA im Zytoplasma notwendig sein. Da bisher keine direkte Interaktion zwischen Sam68 und RRE bzw. CTE nachgewiesen werden konnte, soll Sam68 mit anderen Elementen in der RNA interagieren (- dies spricht für die vermutete Interaktion von Sam68 mit den UAAA-Motiven innerhalb von *wtgag*). Insofern ist es auch möglich, die unterschiedlichen Expressionssteigerungen mit *UTR-gag-RRE* transfizierten Zellen nach Kotransfektion mit pcRev auf die Translationsebene zurückzuführen.

Sam68 ist außerdem ein wichtiger Bestandteil der perinukleolären Struktur SNB (*Sam68 nuclear body*), die vor allem an der nukleären Peripherie positioniert ist (zum Überblick: Huang, 2000). SNBs sind reich an RNA-bindenden Proteinen und Nukleinsäuren, was darauf hin weist, dass SNBs zahlreiche RNPs beinhalten könnten. Sie scheinen aber weder neu-synthetisierte RNA in sich zu konzentrieren, noch mit snRNPs angereichert zu sein. Auch ist bislang unklar, welche Funktionen SNBs innerhalb des Zellkerns haben. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Sam68 auch mit anderen RNA-bindenden Proteinen wie z.B. hnRNP K und YT521-B (*splicing-associated factor*) interagiert, wobei unklar ist, ob diese Proteine zusammen mit Sam68 in den SNBs kolokalisiert werden.

Es wird ebenfalls seit längerer Zeit kontrovers diskutiert, ob die HI-virale RRE-haltige RNA in ein bestimmtes nukleäres Kompartiment dirigiert wird, wo sie dann von Rev erkannt und exportiert wird. Bislang gibt es noch keine Untersuchungen, ob und wieweit

die *wtgag*-RNA aufgrund ihrer zahlreichen UAAA-Motive wegen der Bindung von Sam68 in den SNBs kolokalisiert wird. Die Konstrukte *chl-2* und *chl-3* unterscheiden sich in der Anzahl der Sam68-RNA-Bindestellen. Innerhalb von *chl-2* liegen fünf, innerhalb von *chl-3* dagegen elf der insgesamt 14 in *wtgag* vorkommenden UAAA-Sequenzen. Würde die *wtgag*-RNA aufgrund der UAAA-Motive in die SNBs dirigiert, könnte man den Unterschied in der Pr55<sup>gag</sup>-Expression von mit *chl-2* (gute Expression) und *chl-3* (sehr schlechte Expression) transfizierten Zellen darauf zurückführen, dass die *chl-3*-RNA zwar besser in die SNBs lokalisiert wird, für den nukleären Export daraus aber dann auf die Anwesenheit von Rev und damit RRE angewiesen ist. Die *chl-2*-RNA hingegen wird wegen der Bindung von Sam68 kaum in die SNBs transportiert und kann deshalb leichter von den zellulären Transportfaktoren erkannt und exportiert werden.

Laut der Homepage des Max-Planck-Instituts für Neurobiologie, Martinsried (<http://www.mpg.de>, „Neuron-spezifischen Spleißen“), hat Sam68 eine Funktion beim alternativen Spleißen. Es liegen derzeit aber noch keine Studien vor, ob diese Aktivität vom Zelltyp abhängig ist. Mit dieser Eigenschaft kann erklärt werden, warum die Pr55<sup>gag</sup>-Expression mit *UTR-chl-2-RRE* transfizierten Zellen gegenüber der Transfektion mit *chl-2* drastisch reduziert ist: Durch das Anfügen von UTR und RRE an das *gag*-Plasmid werden wohl Spleißfaktoren an die *gag*-RNA heranrekrutiert. Anhand der UAAA-Motive innerhalb von *gag* wird nun gleichzeitig eine Interaktion mit Sam68 ermöglicht. Durch die Anwesenheit der Spleißfaktoren kommt es unter Vermittlung von Sam68 zum alternativen Spleißen der RNA, weshalb die Pr55<sup>gag</sup>-Expression nach Transfektion mit *UTR-chl-2-RRE* geringer ist als die mit *chl-2* transfizierten Zellen. Da beim alternativen Spleißen auch ESE und ESS Elemente beteiligt sind, kann davon ausgegangen werden, dass der Anteil des alternativen Spleißens der chimären *gag*-RNAs nicht nur von der Anzahl der Sam68-Bindestellen abhängig ist, sondern zusätzlich über ESE und ESS Motive reguliert wird. Darüber hinaus muß das UAAA-Motiv innerhalb einer Schleifenstruktur liegen, um von Sam68 erkannt zu werden (Itoh *et al.*, 2002). Aufgrund der verschiedenen RNA-Enthalpiewerte der chimären *gag*-Konstrukte kann davon ausgegangen werden, dass ihre RNAs unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden. Deshalb zeigen mit *chl-2*, *chl-3*, *chl-3* und *chl-4-6* transfizierte Zellen nach Anfügen von UTR und RRE an die chimären *gag*-Plasmide jeweils einen andersartigen Rückgang der Pr55<sup>gag</sup>-Expression.

Vergleicht man nun die Sam68-Bindestellen von *wtgag* wiederum mit den von Schneider gesetzten Punktmutationen innerhalb von *wtgag*, stellt man fest, dass dadurch alle 5'-UAAA-3' Motive zerstört wurden (Schneider *et al.*, 1997). Auch dieser Zusammenhang wurde bisher in der Literatur noch nie beschrieben.

### ***E. 1.3. Einfluss von UTR und RRE auf die Expression von gag und auf den nukleären Transport der gag-RNA (unter und ohne Einfluss transaktiver HI-viraler Elemente)***

Um den Einfluss *cis*-aktiver Elemente auf die Expression der chimären *gag*-Plasmide auszutesten und gleichzeitig einen etwaigen Zelltyp-spezifischen Effekt auszuschließen, wurden verschiedene Zelllinien transient mit *UTR-chgag-RRE* transfiziert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Gag-Expression mit *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE* transfizierten Zellen

nach Kotransfektion mit pcRev in Primatenzellen zum Teil erheblich gesteigert werden konnte, während die nach Transfektion mit *UTR-ch(3, 4-6)-RRE* annähernd gleich blieb. Dies deutet darauf hin, dass der Wildtyp-Sequenzanteil am 5'-Ende der chimären *gag*-Plasmide für die Rev-abhängige Gag-Expression unter gleichzeitigem Einfluss der *cis*-aktiven Elemente verantwortlich ist. Inwieweit Sam68 daran beteiligt sein könnte, wurde bereits diskutiert.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Nagetierzellen eine Rev/RRE-abhängige Expression des viralen Strukturproteins Pr55<sup>gag</sup> nicht begünstigen. Mariani konnte bereits 2000 zeigen, dass die mRNA-Synthese in murinen Zellen im Vergleich zur Produktion in humanen Zellen geringer abläuft (Mariani *et al.*, 2000). Ebenso ist in Mäusezellen das Assembly von Gag anscheinend blockiert. Mariani *et al.* führten die gestörte Maturation von HIV-1 in diesen Zellen darauf zurück, dass die Strukturproteine nach ihrer Expression in zytoplasmatischen Strukturen - entweder aufgrund des Fehlens eines humanen Hilfsfaktors oder wegen der Anwesenheit eines murinen inhibitorischen Faktors - zurückgehalten werden. In dieser Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass nur die murinen Fibroblastenzellen (NIH-3T3) gegenüber den Primatenzellen (H1299, COS-7) ein gestörtes Gag-Assembly aufweisen. Murine Muskelmyblasten (C2C12) hingegen hatten eine bis zu dreifach höhere Konzentration an Pr55<sup>gag</sup> im Kulturüberstand als die H1299- und COS-7-Zellen (nach Transfektion mit syngag). Alexandra Bojak konnte in ihrer Doktorarbeit („Strategien zur Optimierung von DNA-Vakzine Kandidaten gegen das humane Immundefizienzvirus Typ I“) bereits zeigen, dass zelltypspezifische Unterschiede in der Partikelfreisetzung nicht ausschließlich auf Nagetierzellen bezogen werden können (A. Bojak, Doktorarbeit-RIMMH, 2001).

Neueste Studien von Marques *et al.* weisen darauf hin, dass die gestörte HI-virale Replikation in Mäusezellen auf eine eingeschränkte Rev-Funktion (aufgrund einer Wechselwirkung der C-terminalen Domäne von Rev mit zellulären inhibitorischen Faktoren) zurückzuführen ist (Marques *et al.*, 2003). Aufgrund der Beobachtung, dass nach Transfektion der murinen Zellen mit *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE* und *UTR-wtgag-RRE* nahezu keine Gag-Partikel - auch nicht nach Kotransfektion mit pcRev - in das Zytoplasma entlassen werden, - die Aminosäuresequenz der chimären *gag*-Konstrukte aber dieselbe ist, kann ferner davon ausgegangen werden, dass zusätzlich RNA-bindende Faktoren für den gefundenen Rev-Defekt notwendig sind. Diese müssen am 5'-Ende der *gag*-RNA binden, da eine Störung des Gag-Assemblys, vor allem in NIH-3T3-Zellen, weder bei *UTR-ch3-RRE*- noch bei *UTR-ch4-6-RRE*-transfizierten Zellen nachzuweisen ist. Damit konnte gezeigt werden, dass die gestörte Funktion von Rev in murinen Zellen vom Zelltyp abhängt als auch auf Faktoren zurückzuführen ist, die am 5'-Ende der *gag*-RNA binden. Die Ergebnisse von Alexandra Bojak, die bereits zeigen konnte, dass sich weder der RNA-Export, die Protein-Expression, die Ausbildung und Freisetzung Virus-ähnlicher Pr55<sup>gag</sup>- und Pr55<sup>gag</sup>/Pr160<sup>gagpol</sup>-Partikel, noch die Prozessierung der Vorläuferproteine in Nagetierzellen von den Prozessen in humanen Zellen signifikant unterscheiden, unterstützen diese Hypothese (A. Bojak, Doktorarbeit-RIMMH, 2001).

Zudem konnte gezeigt werden, dass nur die Expression der *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*- und *UTR-wtgag-RRE*-Plasmide sensitiv auf die Kotransfektion mit pcRevM10 reagiert. Dies spricht dafür, dass der Kernexport der nach Transfektion gebildeten RNA Rev-abhängig ist. Berücksichtigt man ferner die unterschiedliche Pr55<sup>gag</sup>-Expression mit *ch1-2*- und

*UTR-ch1-2-RRE*-transfizierten Zellen so kann daraus geschlossen werden, dass die HI-virale Rev-abhängige Expression sich in dem kombinatorischen Zusammenspiel von *cis*- und *trans*-aktiven Elementen begründet.

Betrachtet man den RNA-Export nach Transfektion mit den chimären *gag*-Konstrukten, so ist der Transport der *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*-RNA in gleichermaßen wie der der *UTR-wtgag-RRE*-RNA Rev-abhängig und kann durch RevM10 inhibiert werden. Bei *UTR-ch1-2-RRE*- und *UTR-ch1-3-RRE*-transfizierte Zellen konnte zudem im Northern Blot eine weitere - weniger weit als die *UTR-gag-RRE*-RNA laufende - RRE-spezifische RNA nachgewiesen werden (Nachweis teilweise nur auf Kodak-Filmen erkennbar). Dies spricht dafür, dass durch das Anfügen von UTR und RRE an *ch1-2* und *ch1-3* Spleißfaktoren an die *UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*-RNA heranrekrutiert werden, und es aufgrund des Vorhandenseins zusätzlicher bestimmter 5'-*cis*-ständiger Elemente zum Spleißen dieser RNA kommt. Erste Analysen der zytoplasmatischen RNA-Fraktionen anhand von RT-PCR und anschließender Subklonierung ergaben, dass eine verkürzte *gag*-RNA vorliegt, die anhand des 5'-SD im UTR und einer - nicht näher charakterisierten - Spleißakzeptorstelle innerhalb von *gag* (vor der Position 720) gespleißt wurde. Eine nähere Verifizierung dieser RNA gelang nicht, da sich die über RT-PCR amplifizierte cDNA nicht vollständig sequenzieren ließ. Trotzdem ist diese unvollständige Analyse bemerkenswert. Es scheint, dass eine am 5'-Ende verkürzte *gag*-RNA Rev-unabhängig exportiert werden kann. Dies spricht dafür, dass der Rev-abhängige Export der *UTR-wtgag-RRE*-RNA auf bestimmte *cis*-aktive Sequenzmotive innerhalb des 5'-Endes von *wtgag* zurückzuführen ist. Desweiteren muß von einem RNA-destabilisierenden Effekt dieser Elemente ausgegangen werden, da im Kern nach Transfektion mit *UTR-ch1-2-RRE* nur die verkürzte *gag*-RNA nachzuweisen ist. Nach Kotransfektion mit pcRev ist wieder die vollständige *UTR-ch1-2-RRE*-RNA, neben der kleineren Form, im Kern detektierbar, die dann auch exportiert wird. Daraus kann geschlossen werden, dass Rev einen Einfluss auf die in *cis*-Stellung wirkenden 5'-RNA-Elemente und/oder in *trans*-Stellung daran bindenden Faktoren hat. Außerdem ist die Degradierung der *UTR-wtgag-RRE*-RNA auf *cis*-aktive Sequenzmotive am 5'-Ende von *gag* zurückzuführen.

#### ***E. 1.4. Einfluss von RRE auf die Expression von gag und auf den nukleären Transport der gag-RNA (unter und ohne Einfluss trans-aktiver HI-viraler Elemente)***

Um den Einfluss des 5'-Spleißdonors auf die Gag-Expression analysieren zu können, wurden Transfektionsstudien mit *ch(1-2, 1-3, 3, 4-6)-RRE* durchgeführt.

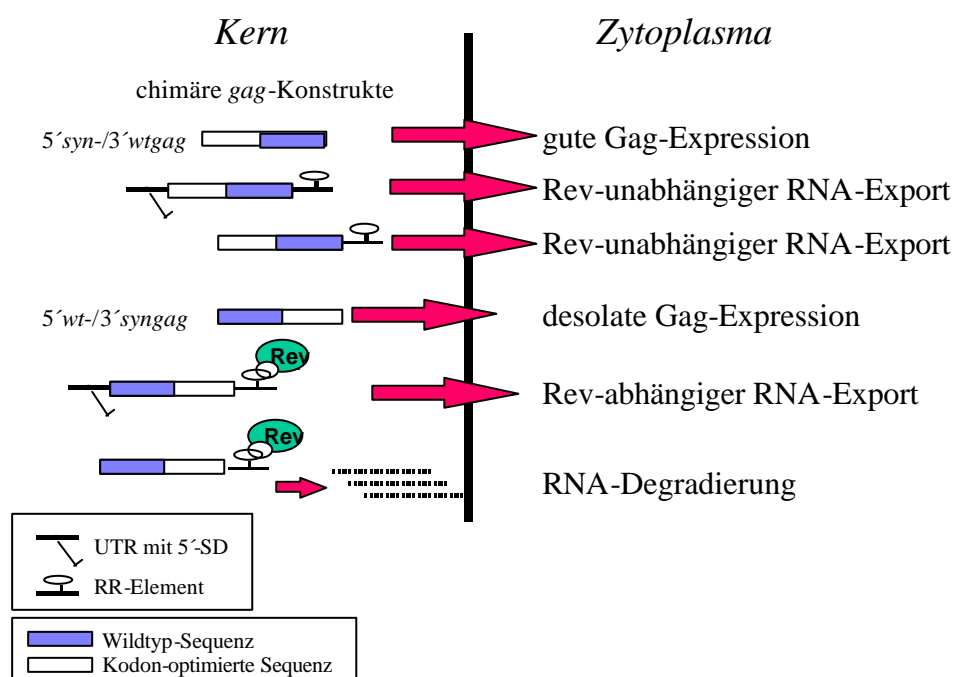
Bei *ch1-3-RRE*-transfizierten Zellen konnte selbst nach Kotransfektion mit pcRev keine Gag-Expression nachgewiesen werden. Dagegen hatten mit *ch1-2-RRE* transfizierte Zellen eine mittelmäßige Expression, die nach Kotransfektion mit pcRev auf dem Niveau von *syngag-RRE*-transfizierten Zellen lag. Die anderen beiden transfizierten Zellen (mit *ch3-RRE* bzw. *ch4-6-RRE* transfiziert) zeigten bereits ohne Kotransfektion mit pcRev sehr gute Pr55<sup>gag</sup>-Expressionswerte.

Bei Betrachtung des RNA-Exportes, stellt man ferner fest, dass nur die RNAs von mit *ch(3, 4-6)-RRE* und *syngag-RRE* transfizierten Zellen bereits ohne Kotransfektion mit pcRev effizient in das Zytoplasma transportiert werden. Die *gag*-RNA von mit *ch1-3-RRE* und *wtgag-RRE* transfizierten Zellen ist dagegen nie nachzuweisen, während die von mit *ch1-2-RRE* transfizierten Zellen - ohne Kotransfektion mit pcRev zwar nur schwach - detektierbar ist.

Damit steht fest, dass 5'-gelegene, *gag*-interne, *cis*-aktive Elemente neben dem 5'-SD eine wichtige Rolle bei der *Gag*-Expression übernehmen. Die Elemente unterliegen einem additiven Effekt (mittelmäßige Expression bei *ch1-2-RRE*-transfizierte Zellen, keine Expression bei *ch1-3-RRE*-transfizierte Zellen) und sind deshalb nur, wenn vollständig vorhanden, inhibitorisch wirksam. Ferner wirkt der 5'-SD (*UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*, *UTR-wtgag-RRE*) stabilisierend auf die RNA von INS-haltigen Plasmide (*ch1-2-RRE*, *ch1-3-RRE*, *wtgag-RRE*). Diese Beobachtung wurde bereits mehrfach in der Literatur erwähnt und bestätigt die Resultate von Marcus Graf (Lu *et al.*, 1990, Seguin *et al.*, 1998, Cui *et al.*, 1999, M. Graf, Doktorarbeit-RIMMH, 2000).

### E. 1.5. Schlußfolgerung

Die Ergebnisse des Einflusses der HI-viralen *cis*-ständigen und *trans*-aktiven Faktoren auf die Expression der chimären *gag*-Plasmide sind in folgender Graphik kurz dargestellt:



**Abbildung E.-4. Abhängigkeit der Expression der *chgag*-Plasmide von *cis*-ständigen Elementen und *trans*-aktiven Faktoren bezogen auf die Position der Wildtyp-Sequenzen.**

Unter Berücksichtigung aller Daten kann nun folgendes Modell aufgestellt werden: Die Genexpression von HIV-1 wird auf Spleißebene bzw. mit Faktoren reguliert, die am Spleißprozess beteiligt sind. Ohne 5'-SD (UTR) und bei Anwesenheit der 3'- (RRE) und

aller 5'-lokalisierten *gag*-internen *cis*-aktiven Elemente (*chl-3-RRE* und *wtgag-RRE*) kommt es zu einer Degradierung der nach Transfektion gebildeten RNA. Ist der 5'-SD vorhanden, aber nicht alle *cis*-aktiven Elemente (*UTR-chl-2-RRE*), so ist nach Transfektion eine verkürzte *gag*-RNA nachzuweisen und eine gegenüber mit *chl-2* transfizierten Zellen stark reduzierte Pr55<sup>gag</sup>-Expression festzustellen. Ferner konnte gezeigt werden, dass *chl-2*-transfizierte Zellen einen Defekt im Assembly von Gag haben. Daraus kann nun folgendes geschlossen werden: Die verkürzte *gag*-RNA stammt aus einem alternativen Spleißvorgang. Es kommt nur effizient zum alternativen Spleißen, wenn der 5'-SD aber nicht alle *gag*-internen *cis*-aktiven Elemente vorhanden sind (*UTR-chl-2-RRE*). Existieren dagegen alle diese Motive, so überwiegt die destabilisierende Eigenschaft der Elemente, und es kommt zur Degradierung der RNA (*chl-3-RRE*). Erst nach Anfügen des 5'-SD ist diese RNA stabilisiert (*UTR-chl-3-RRE*). Fehlen allerdings sowohl der 5'-SD als auch der 3'-SA (*chl-3*), so kann immerhin eine mäßig gute Expression des *gag*-Plasmides erreicht werden. Daraus folgt, dass die Anwesenheit von 5'-SD inhibitorische Sequenzmotive in der *gag*-RNA stabilisieren kann, diese Motive aber für ihre starke destabilisierende Wirkung das RR-Element benötigen.

Die gegenüber *chl-2*-transfizierten Zellen stark reduzierte Gag-Expression nach Transfektion mit *UTR-chl-2-RRE* rührt daher, dass es bei Vorhandensein des 5'-SD bei der daraus gebildeten RNA effizient zum alternativen Spleißen kommt. Erste Analysen lassen vermuten, dass dem Spleißprodukt bis zu 720 Nukleotide am 5'-Ende von *gag* fehlen. Deshalb kann nicht sichergestellt werden, dass das verkürzte Gag-Protein mit dem p24-Antikörper nachgewiesen werden kann. Desweiteren kann vermutet werden, dass bereits die RNA von mit *chl-2* transfizierten Zellen alternativ gespleißt wird. Dadurch würden sich, neben den normalen Gag-Proteinen auch 5'-verkürzte Isoformen an die Plasmamembran anordnen. Ihnen würde aber die Myristilierungsstelle fehlen, weshalb es zu einem gestörten Assembly von Gag kommt, welches sich in einer stark verminderten Sekretion von Pr55<sup>gag</sup> äußert.

Darüber hinaus läßt sich der Unterschied in der Expression der Plasmide *chl-3*, *UTR-chl-3-RRE* und *chl-3-RRE* wie folgt erklären: Die nach Transfektion mit *chl-3-RRE* resultierende RNA wird aufgrund ihrer *gag*-internen *cis*-aktiven destabilisierenden Elementen degradiert. Bei Anwesenheit des 5'-SD und des 3'-SA (*UTR-chl-3-RRE*) erfüllt diese RNA die (typisch eukaryontische) Voraussetzung anhand des Spleißens prozessiert werden zu können. Deshalb ist auch die Gag-Expression nach Transfektion mit *UTR-wtgag-RRE* gegenüber der von *wtgag*-transfizierten Zellen gesteigert. Der Unterschied zwischen *UTR-chl-3-RRE*- und *UTR-wtgag-RRE*-transfizierten Zellen in der Expressionsrate kann dadurch erklärt werden, dass durch den synthetischen Anteil von *chl-3* die RNA-Enthalpie und mit ihr die Stabilität aufgrund der reinen Nukleinsäuresequenz verbessert wird. Die schlechte Gag-Expression nach Transfektion mit *chl-3* könnte mit einer Lokalisierung der *chl-3*-RNA in SNBs (siehe Diskussion über Sam68) zusammenhängen. Dabei könnte auch hier die andersartige Stabilität der RNA für den Expressionsunterschied von *chl-3*- und *wtgag*-transfizierten Zellen verantwortlich sein.



## E.2. Bedeutung von „kryptischen“, internen Spleißdonoren für die Genexpression von HI-viralen GFP-Konstrukten und für den nukleären Export der HI-viralen GFP-RNA (unter und ohne Einfluss *cis*- und *trans*-aktiver HI-viraler Elemente)

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass Spleißstellen als *cis*-aktive Repressorsequenzen („*cis-acting repressor sequences*“, CRS) fungieren und die Expression Rev-abhängiger RNA regulieren können (Chang *et al.*, 1989, Barksdale *et al.*, 1995, Mikaelian *et al.*, 1996). 1999 konnte Borg darstellen, dass RNA-Produkte, die einen „kryptischen“ Spleißdonor enthalten, für die zytoplasmatische Akkumulation der ungespleißten RNA Rev benötigen, während gespleißte RNA unabhängig von Rev ist (Borg *et al.*, 1999). Desweiteren zeigte Borg, dass Wildtyp-Konstrukte, denen der 5'-SD fehlte, anhand „kryptischen“ Spleißdonoren die Rev-Regulation beibehalten können.

Um zu überprüfen, inwieweit „kryptische“ Spleißdonoren als CRS die Rev-Abhängigkeit viraler RNAs bestimmen und bei der Regulation der *hivGFP*-Expression zum Tragen kommen, wurde ein Plasmid entworfen, indem sowohl alle internen „konsensus“ als auch - so weit wie möglich - alle „kryptischen“ Spleißdonoren innerhalb von *hivGFP* mutiert wurden (***DdGFP***).

Da ***DdGFP***-transfizierte Zellen dasselbe Expressionsverhalten wie *hivGFP*-transfizierte Zellen zeigen, können „kryptische“ Spleißdonoren nicht für die HIV-typische Expressionsabhängigkeit (Notwendigkeit der Anwesenheit von *cis*- und *trans*-aktiven Elementen) nach Transfektion mit *hivGFP* verantwortlich sein, da sonst die Expression dieses Plasmides von diesem Regulationssystem entkoppelt sein müßte (Diese Aussage wird unter der Annahme gemacht, dass alle „kryptischen“ Spleißdonoren erfolgreich deletiert wurden! - siehe Zusammenfassung D.3.4.).

Ferner konnte hier dargestellt werden, dass die RNA-Enthalpie einen Einfluss auf die Stabilität der RNA hat, sich aber nicht aus dem A/U-Gehalt der Plasmide begründet.

Führt man (anhand einer selbstgeschriebenen Datei) Computeranalysen durch, so stellt man fest, dass in der Sequenz für *hivGFP* 15 Sam68-Bindestellen kreiert worden sind, das ***DdGFP***-Konstrukt immerhin noch zehn Sam68-Motive aufweist und das *huGFP*-Plasmid nur eine einzige UAAA-Sequenz besitzt.

(Desweiteren wurden in *hivGFP* auch ARE-, SC35- und SF2/ASF-Bindestellen detektiert: Da die Bedeutung dieser RNA-Motive bei der HIV-1 viralen Genexpression aber wie bereits diskutiert eher zu vernachlässigen sind, werden sie hier nicht weiter beschrieben.)

### Schlußfolgerung

Es konnte anhand dieser Studie gezeigt werden, dass die durch die Kodonadaption von *huGFP* an HIV erzeugten „kryptischen“ Spleißdonoren nicht die Ursache für die Rev-

abhängige Expression von *hivGFP* sind. Bemerkenswert ist auch hier die große Anzahl der Sam68-Bindestellen innerhalb von *hivGFP*.

### **E.3. Bedeutung des Kodongebrauchs für die Genexpression von HI-viralen GFP-Konstrukten und für den nukleären Export der HI-viralen GFP-RNA (unter und ohne Einfluss *cis*- und *trans*-aktiver HI-viraler Elemente)**

Darüber hinaus wurden weitere GFP-Reporterkonstrukte entworfen, um zu überprüfen, inwieweit der A/U-Gehalt von *hivGFP* (ca. 69% A/U) für die Rev-abhängige GFP-Expression dieses Konstruktes verantwortlich ist. Bei diesen Plasmiden wurde jeweils der Anteil von A/U in der *gfp*-Sequenz schrittweise gesenkt ohne dabei Rücksicht auf den HI-viralen Kodongebrauch zu nehmen (*e1GFP*: ca. 55, *e2GFP*: ca. 50, *e3GFP*: ca. 45% A/U). Als Kontrollplasmid diente ferner ein GFP-Konstrukt, dessen G/C-Gehalt soweit wie möglich vermindert wurde, ohne aber den humanen Kodongebrauch zu verändern (*cuGFP*: ca. 47% A/U).

Anhand dieser Konstrukte kann belegt werden, dass der hohe A/U-Gehalt von *hivGFP* nicht für seine Rev-abhängige GFP-Expression verantwortlich ist. Dies ist die erste Studie darüber, inwieweit der bloße A/U-Gehalt eine Rolle bei der HI-viralen Genexpression spielt. Es hat sich auch hier erwiesen, dass unterschiedliche RNA-Stabilitäten auf die zugrundeliegenden Enthalpien zurückzuführen sind, diese sich aber nicht mit dem A/U-Gehalt der Plasmide erklären lassen. Ferner zeigen diese Versuche, dass zwar mit steigendem G/C-Gehalt in der Regel auch die RNA-Enthalpie zunimmt, das beste Expressionsplasmid (für Versuche in humanen Zellen) aber nicht die beste RNA-Enthalpie benötigt, sondern den humanen Kodongebrauch. Dies ist ein Indiz dafür, dass die RNA-Enthalpie vom A/U-Gehalt nur in gewissem Maße beeinflusst wird (Ein sehr hoher A/U-Gehalt der Expressionsplasmide führt zu einer schlechten Expression, allerdings führt stufenweise Erniedrigung des A/U-Gehaltes der Expressionsplasmide nicht zu einer stufenweise Verbesserung der Expression.), die Stabilität der RNA und eine erfolgreiche Expression aber grundsätzlich von weiteren Faktoren abhängt.

Führt man hier die bereits beschriebenen Computeranalysen durch, so findet man in *e1GFP* vier, in *e2GFP* zwei, in *e3GFP* drei und in *cuGFP* keine Sam68-Bindestellen. Würde sich herausstellen, dass die Motive für Sam68 eine Bedeutung für die HI-virale Genregulation haben, so könnte man die verbesserte GFP-Expression nach Transfektion mit *e(1, 2, 3)GFP* gegenüber *hivGFP*-transfizierte Zellen auch dadurch erklären, dass bei den *eGFP*-Konstrukten erheblich weniger Sam68-Bindestellen vorhanden sind, weshalb ihre Expression von der Regulation durch *cis*- und *trans*-aktive Elemente teilweise entkoppelt sind (immerhin mäßig gute GFP-Expression nach Transfektion mit *e(1, 2, 3)GFP*).

Die doch erheblich schlechtere GFP-Expression nach Transfektion mit *e3GFP* gegenüber *huGFP*-transfizierten Zellen (der A/U-Gehalt dieser GFP-Plasmide variiert nur um 5%) kann zudem dadurch erklärt werden, dass bei *e3GFP* die HI-virale Kodon-„Usage“ zugrunde lag, weshalb die Expression des *e3GFP*-Plasmides im humanen System schlechter ist.

Der Rückgang der GFP-Expression transfizierter Zellen nach Anfügen von UTR und RRE an die GFP-Plasmide könnte neben einer schlechteren Transfektionseffizienz (UTR und RRE verlängern die Plasmide um nahezu 1 kb) auch darauf zurückzuführen sein, dass es durch die Zugabe von 5'-SD und 3'-SA teilweise zum Spleißen der nach Transfektion gebildeten RNA kommt, weshalb die daraus resultierenden GFP-Proteine in den jeweiligen Testsystemen nicht mehr erkannt werden. Dafür sprechen die zusätzlich im Northern Blot aufgefundenen RNA-Banden bei *UTR-huGFP-RRE*- und *UTR-e(1, 2, 3)-RRE*-transfizierten Zellen.

Die Unterschiede in der GFP-Expression von *UTR-e(1, 2, 3)GFP-RRE*-transfizierten Zellen nach Kotransfektion mit einem Rev-Plasmid, die nicht mit der absoluten Anzahl der Sam68-Bindestellen in den GFP-Konstrukten korrelieren, könnten damit zusammenhängen, dass bei diesen Plasmiden durch Erhöhung des G/C-Gehaltes zu einem gewissen Teil die humane Kodon-„Usage“ verwendet wurde, deren Verteilung in der Nukleinsäuresequenz von *e(1, 2, 3)GFP* aber zufallsmäßig gestreut ist. Ebenso erklärt sich die stets schlechtere GFP-Expression der *cuGFPs* (*cuGFP*, *UTR-cuGFP-RRE*)-transfizierten Zellen gegenüber den *huGFPs* (*huGFP*, *UTR-huGFP-RRE*)-transfizierten Zellen dadurch, dass hier nicht das absolut optimale humane Kodon verwendet wurde.

### **Schlußfolgerung**

Es konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass nicht der reine A/U-Gehalt für die Regulation während der HI-viralen Genexpression verantwortlich ist. Daher kann man durch eine stufenweise Erniedrigung des A/U-Gehaltes Rev-abhängiger Reporterkonstrukte keine schrittweise Verbesserung der Genexpression der Plasmide bewirken. Dies ist ein Indiz dafür, dass die RNA-Enthalpie vom A/U-Gehalt nur in gewissem Maße beeinflusst wird (Ein sehr hoher A/U-Gehalt der Expressionsplasmide führt zu einer schlechten Expression, allerdings führt stufenweise Erniedrigung des A/U-Gehaltes der Expressionsplasmide nicht zu einer stufenweisen Verbesserung der Expression.), die Stabilität der RNA und eine erfolgreiche Expression aber grundsätzlich von weiteren Faktoren abhängen. Ebenso wird für eine optimale Genexpression im humanen System der humane Kodongebrauch benötigt.

## **E.4. Bedeutung des Kodongebrauchs für die zeitlich regulierte Genexpression im Rahmen von HI-viralen chimären Provirus-Konstrukten**

Bevor die Ergebnisse der Provirus-Konstrukte diskutiert werden, soll an die bereits gemachten Ausführungen (Einleitung / Diskussion) über die Regulation der eukaryontischen sowie der HI-viralen Genexpression erinnert werden.

Es hat sich in der Vergangenheit immer wieder als schwer und problematisch erwiesen, Ergebnisse von HI-viralen Reporterkonstrukten auf den HI-Provirus zu übertragen. Hier darf nicht vergessen werden, dass man bei Experimenten mit HI-Provirus-Konstrukten unter dem Einfluss der HI-viralen Regulation steht bzw. diese beeinflusst (natürlich nichtsdestoweniger im zellulären Umfeld), mit HI-viralen Reporterkonstrukten dagegen zusätzlich HI-virale Transkripte in die zelluläre Genregulation einbringt.

Desweiteren soll eine in dieser Arbeit noch nicht diskutierte HI-virale Regulationseinheit erläutert werden, um später darauf zurückgreifen zu können. Neben der unumstrittenen Rev-abhängigen Regulation der Genexpression später HIV-Transkripte, gibt es wahrscheinlich noch eine weitere, die während der Replikation zum Tragen kommt. Diese soll an dieser Stelle erwähnt werden.

#### ***IRES („Internal Ribosome Entry Site“)***

Die Initiation der Erkennung der 7-Methylguanosinium-Kappe ist das Kennzeichen eukaryontischer Translation. Mittlerweile hat man aber eine Reihe von Viren entdeckt, deren Translation von den internen Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES) ausgeht (zum Überblick: [www.rangueil.inserm.fr/iresdatabase](http://www.rangueil.inserm.fr/iresdatabase)). Klassische IRES-Elemente liegen in der 5'-Nichtkodierungsregion. Sie umfassen einige hundert Nukleotide in Sekundärschleifen und enthalten als typisches Merkmal eine Strecke mit zahlreichen Pyrimidin-Nukleotiden, in kurzem Abstand gefolgt vom AUG-Startkodon. Voraussetzung für die Verwendung von IRES zur Translation sind zelluläre Proteine, die an die RNA-Schleifen und an die Polypyrimidin-Strecke binden. Daraufhin werden die Proteine eIF-4A und eIF-4B (*eIF* -, „eukaryotische Initiations-Faktoren“) herangezogen, die die RNA-Struktur glätten und dadurch die Assoziation der 40S-Ribosomen-Untereinheit vorbereiten (zum Überblick: Knippers, Molekulare Genetik, Lehrbuch, 1997).

2001 konnte Buck im *gag*-Leserahmen von HIV-1 IRES-Aktivität feststellen. Er vermutete, dass sie für die Produktion von Pr55<sup>gag</sup> und einer verkürzten Isoform von Gag (p40) genutzt wird (interner Translationsbeginn von *wtgag* anhand AUG an Position 424) (Buck *et al.*, 2001). Darüber hinaus spekulierte er, dass p40 für die Wachstumskinetik von HIV *in vitro* benötigt wird und glaubte, dass die *gag*-interne IRES dazu dient, strukturelle Barrieren an AUG<sub>1</sub> zu umgehen, indem sie direkt Ribosomen an den *gag*-Leserahmen heranrekrutiert. Die neueste Studie von Brasey konnte nun auch im 5'-LTR von HIV-1 eine IRES identifizieren (Brasey *et al.*, 2003). Sie überlappt im HIV-1-Genom mit der Primerbinde- (PBS) und Dimerisierungsstelle (DIS), dem 5'-Spleißdonor und einem großen Anteil der Verpackungssequenz  $\psi$  und endet vor dem Startkodon von *gag*. Diese IRES sollte für die Translation von Gag und Gag-Pol während der G<sub>2</sub>/M-Phase verantwortlich sein und somit eine aktive Rolle während der HIV-1-Replikation übernehmen. Desweiteren sollte die von Buck entdeckte IRES bedeutungslos für die Herstellung von Pr55<sup>gag</sup> sein. Ferner wurde beobachtet, dass die IRES-vermittelte Initiation der Translation die RNA stabilisiert.

Das interne Startkodon der von Buck lokalisierten IRES befindet sich an Position 424. Damit ist die IRES-Struktur von *gag* nur in dem chimären Provirus-Konstrukt *HXsynSpeApa* und dem Wildtyp *HX10* enthalten. Die von Brasey identifizierte IRES sollte dagegen in allen hier vorliegenden Provirus-Konstrukten enthalten sein.

### ***E.4.1. Bedeutung des Kodongebrauchs chimärer HI-Proviren für die Expression und Partikelbildung***

#### ***E.4.1.1. Protein-Expression der chimären HI-Proviren***

In Analogie zu den vorgestellten chimären *gag*-Konstrukten, wurden drei chimäre Proviren erzeugt, in denen bestimmte Sequenzbereiche innerhalb von *gag* an die Kodonwahl von hochexpmierenden Säugetiergenen angepaßt wurden. Desweiteren wurde eine Mutante verwendet, bei der fast der gesamte *gagpol*-Leserahmen kodonoptimiert war.

Zur genaueren Charakterisierung der chimären Proviren sollte die molekularbiologische Beschaffenheit ihrer Proteine mit dem Wildtyp verglichen werden.

Hierbei konnte anhand eines p24 *Capture Assay*-ELISA's gezeigt werden, dass die chimären Proviren, die am 5'-Ende synthetische Sequenzen haben, einen starken Rückgang der p24-Expression gegenüber dem Wildtyp haben. Diese korrelierten mit den jeweiligen p24-Sekretionsraten. Der Virus, der am 3'-Ende von *gag* kodonoptimiert ist, hatte dagegen eine gute p24-Expression. Darüber hinaus konnte anhand von Western Blots nachgewiesen werden, dass die erniedrigte p24-Expression der chimären Proviren mit einem Prozessierungsfehler von Gag zusammenhängt.

Außerdem exprimierten nur die Proviren („*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynSpe-Apa*“, „*HX10*“), deren p24-Protein im Western Blot nachzuweisen war, auch Env und RT (*Reverse Transcriptase*) detektierbar. Bei den Virusmutanten „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsyn*“ kann man vermuten, dass aufgrund fehlender Interaktion zwischen Gag und Env eine Partikelbildung während der Replikation unterbleibt, oder auch, dass Env bereits unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Eine dritte Erklärung wäre hier, dass die Expression von *gag* so schnell abgeschlossen ist, dass es zur Ausknospung „nackter“ Viruspartikel kommt (deren Gag-Derivate aber unterhalb der Nachweisgrenze liegen).

Damit führt ein Prozessierungsdefekt von Gag ebenfalls zu einer gestörten Expression von Env und RT.

Bereits vor zwei Jahren wurde berichtet, dass die Aktivität der identifizierten *gag*-internen IRES für den HIV-Lebenszyklus wichtig ist (Buck *et al.*, 2001). Es wird inzwischen vermutet, dass RNA-Strukturen im 5'-LTR, die bei der Regulation des Spleißens, Polyadenylierung, Dimerisierung, Verpackung, Primerbindung und reverse Transkription beteiligt sind, die Translation inhibieren, indem sie die Assoziierung der 40S-Ribosomen blockieren (zum Überblick Buck *et al.*, 2001). Buck vermutete deshalb, dass die *gag*-internen IRES dazu dienen sollen, strukturelle Barrieren am AUG<sub>1</sub> zu umgehen, um Ribosomen direkt an den Leserahmen von *gag* heranzuziehen.

Mit Hilfe des Gag-Western Blots konnte gezeigt werden, dass p40 nur nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* nachzuweisen ist. Aufgrund der Eigenschaft von IRES Elementen, ausgeprägte Sekundärstrukturen auszubilden, wird wohl die *gag*-interne IRES aufgrund der 5'-Sequenzmodifikationen in *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* zerstört worden sein. Somit fehlt den daraus resultierenden Proviren das Element, das eine von der 7-Methylguanosinium-Kappe unabhängige Translation ermöglicht. Deshalb ist die schlechte Expression der chimären Viruskonstrukte mit den 5'-kodonoptimierten Sequenzanteilen wohl auch auf Translationsebene zurückzuführen.

Bei *HXsynCla-Spe*-transfizierten Zellen ist im Gag-Western Blot eine zusätzliche spezifische Bande von etwa 30 kDa nachzuweisen. Da der Western Blot mit dem 16/4/2-Antikörper durchgeführt wurde, ist davon auszugehen, dass dieses Gag-Derivat p24 beinhaltet. Nach 72 Stunden konnte im Western Blot dieses Produkt nicht mehr nachgewiesen werden. Aufgrund der durchgeführten Sequenzmodifikationen wird vermutet, dass dieses Gag-Derivat aus einem alternativen Spleißvorgang hervorgegangen ist. Es entsteht allerdings nicht bei *HXsynNsp-Spe*- und *HXsyn*-transfizierten Zellen. Das kann dadurch erklärt werden, dass diese drei Plasmide zwar alle zwischen der *Nsp* V- und *Spe* I-Schnittstelle kodonoptimierte Sequenzen beinhalten, *HXsynCla-Spe* und *HXsyn* jedoch zusätzlich bis zur *Cla* I-Restriktionsstelle und *HXsyn* bis zur „*slippery site*“ modifiziert wurden. Damit ist davon auszugehen, dass die nach Transfektion gebildete

RNA jeweils unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden. Nur die Konformation der *HXsynCla-Spe*-RNA ermöglicht dabei einen Spleißvorgang, der zur Translation des etwa 30 kDa-großen Proteins führt. Ob und wie weit das etwa 30 kDa-Protein zur fehlerhaften Prozessierung des *HXsynCla-Spe*-Provirus beiträgt, kann aber nicht gesagt werden.

#### ***E.4.1.2. RNA-Stabilität und RNA-Verteilung nach Transfektion mit den HI-Proviruskonstrukten***

Vergleicht man die RNA-Enthalpien und den A/U-Gehalt des *gag*-Gens der chimären Proviren untereinander, so stellt man fest, dass die RNA-Enthalpie mit steigendem G/C-Gehalt zunimmt. Es existiert jedoch keine Korrelation zwischen der RNA-Enthalpie bzw. dem A/U-Gehalt und der jeweiligen Expressionsraten der Provirus-Plasmide. So zeigt der Provirus mit der schlechtesten RNA-Enthalpie und dem höchsten A/U-Gehalt („*HX10*“) die beste p24-Expressionsrate. Berücksichtigt man ferner, dass die Stabilität der RNA auch von deren Sekundärstruktur abhängt, die wiederum von der Nukleinsäuresequenz beeinflusst wird, so ist dies ein Indiz dafür, dass *cis*-ständige Motive über *trans*-aktive Faktoren einen stabilisierenden Einfluss auf HI-virale RNAs haben.

Zudem wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt um nachzuprüfen, inwieweit die schlechte Protein-Expressionsrate auf RNA-Ebene zurückzuführen ist. Hier konnte gezeigt werden, dass die RNA-Verteilung nach Transfektion mit den chimären Konstrukten, deren 5'-*gag*-Sequenz kodonoptimiert sind (*HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe*), nicht mehr so dominierend auf der Seite der einfach gespleißten RNAs liegt wie bei mit Wildtyp transfizierten Zellen bzw. zur ungespleißten RNA (bei *HXsyn*-transfizierte Zellen) verschoben ist. Nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* dagegen sind eindeutig die einfach gespleißten RNAs vorherrschend.

Außerdem konnte nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* und *HXsynNsp-Spe* auch nach 15 Stunden kein effizienter RNA-Export nachgewiesen werden. Demzufolge korreliert die schlechte Gag-Expression dieser Provirus-Konstrukte mit einer geringen Konzentration an ungespleißter RNA im Zytoplasma. Die niedrige nukleäre Konzentration an viraler RNA kann durch das Fehlen von Tat bedingt sein. Aufgrund des synthetischen Sequenzanteiles kann es zu einer basalen Transkription der 5'-modifizierten Proviren kommen, so dass zwar die ungespleißte RNA nachzuweisen ist, aber aufgrund der Abhängigkeit des LTR Promoters von Tat diese nur in einer sehr geringen Quantität auftritt. Insgesamt kann allerdings nicht gesagt werden, inwieweit Degradierung, schlechte Transkription oder ineffizienter Transport der RNA nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe* und *HXsynNsp-Spe* zusammen spielen.

Die niedrige p24-Expression nach Transfektion mit *HXsyn* dagegen scheint nicht auf einer schwachen Konzentration der ungespleißten RNA im Zytoplasma begründet liegen. Insofern sind hier für die desolate Gag-Expression zytoplasmatische RNA- und/oder Protein-Prozessierungsprozesse verantwortlich zu machen. Demzufolge konnte mit der Northern Blot-Analyse gezeigt werden, dass die bisher vermutete Annahme, dass die niedrige p24-Expression nach Transfektion mit *HXsyn* auf ein Fehlen von Tat hin und damit auf eine geringe Transkription begründet liegt, nicht zutrifft (M. Graf, Doktorarbeit-RIMMH, 2000). Insofern weist die beobachtete Steigerung der p24-Expression von

*HXsyn*-transfizierten Zellen nach Kotransfektion mit pcTat auf eine weitere Funktion von Tat im Replikationszyklus von HIV-1 hin.

Bereits 1992 konnte Parkin zeigen, dass ein erfolgreicher Leserastersprung („*frameshift*“) zwischen *gag* und *pol in vivo* von der Sekundärstruktur der 3′-Sequenzumgebung der „*slippery site*“ abhängig ist (Parkin *et al.*, 1992). Da die Sequenz von *HXsyn* direkt bis zum Beginn der „*slippery site*“ kodonoptimiert ist, könnte es sein, dass sich die 5′-Sequenzumgebung der „*slippery site*“ auf die Sekundärstruktur ihrer 3′-Sequenzumgebung derart auswirkt, dass sich die für den erfolgreichen Leserastersprung benötigte 3′-Konformation nicht mehr ausbilden kann. Demzufolge kommt es zu keiner oder reduzierten Bildung der Gag/Pol-Fusionsproteine, was sich letztendlich in einer gestörten Virusprozessierung äußert.

Die zur Wildtyp-Situation geänderte RNA-Verteilung nach Transfektion mit den 5′-kodonoptimierten chimären Provirus-Konstrukte könnte in einem Wechselspiel von ESE, ESS, Sam68 und der Spleißosomenmaschinerie begründet liegen. ESE und ESS sind, wie bereits erläutert, bei der Auswahl der Spleißstellen beteiligt. Insofern könnte es sein, dass durch neue ESE- und ESS-Motive in diesen Konstrukte nicht mehr in gleicherweise auf den SD für die viralen Hilfsproteine (einfach gespleißte RNAs) zurückgegriffen wird, wie es während der zeitlich regulierten HI-viralen Genexpression der Fall ist.

Betrachtet man nun inwieweit die Sam68-Bindestellen durch die Chimerisierung der Sequenz zerstört wurden (*HX10* in Analogie zu *wtgag* 14, *HXsyn* in Analogie zu *syngag* keine Sam68-Motive im *gag*-Leserahmen), so kann man folgendes feststellen: Bei *HXsynCla-Spe* wurden die ersten acht Motive deletiert, bei *HXsynNsp-Spe* die Motive drei bis acht, wohingegen *HXsynSpe-Apa* die ersten acht der insgesamt 14 Sam68-Bindestellen von *wtgag* besitzt.

Das zuvor diskutierte Modell für die Beteiligung von Sam68 an der Regulation der Expression von *wtgag* kann jetzt nicht in selber Weise auf den Provirus übertragen werden. Zuvor wurde ein HI-virales Transkript in die zelluläre Genregulation eingebracht. Danach wurde erläutert, welche zusätzlichen zellulären Faktoren aufgrund *cis*-ständiger RNA-Motive heranrekrutiert werden und eine Rolle ausüben könnten, die sie im normalen zellulären Umfeld nicht hätten. Jetzt aber hat man Provirus-Konstrukte, die unter dem Einfluss der HI-viralen Regulation stehen, verändert. Deshalb muß jetzt betrachtet werden, ob dadurch das Heranziehen notwendiger zellulärer Faktoren verändert wird und wie sich das auf die HIV-Regulation auswirkt. Dies stellt sozusagen einen Perspektivenwechsel dar.

Unter der zuvor dargestellten Aussagen über die Funktionen von Sam68 und unter Berücksichtigung, dass Rev nur „im Entstehen begriffene“ RNA-Transkripte als Substrate für den Export benutzt (Iacampo und Cochrane, 1996), läßt sich nun folgendes, bisher noch nie beschriebenes, Modell aufstellen:

Bei Anwesenheit von Rev und den UAAA-Motiven in der RNA wird Sam68 an den Spleißosomenkomplex herangezogen. (Es wurde bislang immer wieder spekuliert, dass die späten HIV-1-Transkripte aufgrund der Spleißstellen mit unterschiedlicher Effizienz (starker SD, schwacher SA) oder aufgrund *cis*-aktiver Elemente im Spleißosomenkomplex hängen bleiben (Chang *et al.*, 1989; Kjems *et al.*, 1991; Nasioulas *et al.*, 1994; Mikaélian *et al.*, 1996).) Die Präsenz von Sam68 sorgt dann für eine frühzeitige Rekrutierung von

RHA (*RNA helicase A*) an die Spleißmaschinerie (Reddy *et al.*, 2000 – Interaktion von Sam68 mit RHA), wodurch die noch ungespleißte bzw. erst einfach gespleißte RNA aus dem Spleißosomenkomplex entlassen werden kann und nun für den Kernexport zur Verfügung steht. Es wurde bereits diskutiert, dass Sam68 eventuell auch eine Rolle beim HI-viralen RNA-Transport und Translation zukommt.

Mit diesem Modell könnten nun die unterschiedlichen p24-Expressionsraten nach Transfektion mit den chimären Viruskonstrukte erklärt werden. Den 5'-kodonoptimierten Provirus-Konstrukten fehlen mehr oder weniger die 5'-lokalisierten UAAA-Motive in *gag*. Die Bedeutung der 5'-Hälfte von *gag* und der viralen Spleißstellen bei der HIV-Replikation wurde immer wieder in der Literatur als auch in dieser Arbeit belegt (Schwartz *et al.*, 1992, Schneider *et al.*, 1997, Borg *et al.*, 1997, Cui *et al.*, 1999). Zusätzlich sind aber die starken bzw. schwachen HI-viralen Spleißdonor- und -akzeptorstellen vorhanden. Deshalb kann die chimäre RNA, die nach Transfektion mit diesen Konstrukten produziert wurde, nicht effizient vom Spleißosom freigesetzt werden. Der Unterschied in der RNA-Verteilung nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* könnte wie folgt erklärt werden. Die Expression der Konstrukte mit dem größeren synthetischen Anteil (*HXsynCla-Spe*, *HXsyn*) unterliegen aufgrund der humanen Kodon-„Usage“ weniger der Regulation durch Rev als *HXsynNsp-Spe*-transfizierte Zellen. Hier kommt es zu einer wechselseitigen Kombination des zellulären mit dem viralen Regulationssystem.

#### **E.4.1.3. Schlußfolgerung**

Im proviralen Umfeld konnte dargestellt werden, dass Zellen, die mit den HI-Proviruskonstrukten transfiziert wurden, die Sequenzmodifikationen am 5'-Ende von *gag* hatten, reduzierte p24-Expressionen als auch -Sekretionen zeigen. Zudem verursacht die Veränderung des Kodongebrauchs bei den Proviren eine gestörte Prozessierung von Gag und es kommt zu einem verminderten oder keinem Einbau von Env in die korrespondierenden Viruspartikel. Die erniedrigte Expressionsrate der späten HIV-Gene kann dabei auf RNA-Ebene zurückgeführt werden. Inwieweit Sam68, ESE, ESS und Tat zur schwachen Konzentration der RNA beitragen wurde diskutiert. Darüber hinaus wird vermutet, dass nicht nur Spleißen und Transkription, sondern auch die Translation anders als beim Wildtyp verläuft.

#### **E.4.2. Bedeutung des Kodongebrauchs der chimären Proviren für die Infektiösität der gebildeten Viruspartikel**

Zur weiteren Charakterisierung der chimären Proviren sollte ihre Infektiösität analysiert werden. Dazu wurde zum einen der „MAGI“-Assay herangezogen, zum anderen wurden die infektiösen Einheiten mittels Titration bestimmt.

Hierbei wurde gefunden, dass nur Zellkulturüberstand von mit *HXsynSpe-Apa* bzw. *HX10* transfizierten H1299-Zellen HeLa-LTR- $\beta$ -Gal-Zellen infizieren konnte. Je nach Virusverdünnung war der freigesetzte chimäre Virus im Durchschnitt um den Faktor fünf bis 20 weniger infektiös als der Wildtyp. Da die ausgezählten blauen Zellen jeweils auf 100 ng p24 standardisiert wurden, dürfte dieser Unterschied auf eine verzögerte Replikation des *HXsynSpe-Apa*-Provirus gegenüber dem Wildtyp zurückzuführen sein. Die „Nicht-



Infektiösität“ der anderen chimären Proviren kann dadurch erklärt werden, dass es bei ihnen zu einem fehlerhaften bzw. keinem Einbau von Env in die Viruspartikel kommt. Dadurch fehlt der virale Interaktionspartner (gp120) für den zellulären CD4-Rezeptor, wodurch die Viren nicht an ihre Zielzelle binden können.

Für die Titration wurden humane Lymphozyten mit einer seriellen Zellkulturüberstandsverdünnung transfizierter H1299-Zellen infiziert. Dabei konnten für alle Proviren Virustiter berechnet werden. Das Verhältnis der infektiösen Einheiten der chimären HI-Previren zueinander entsprach dabei der Tendenz der ermittelten prozentualen p24-Expressionsraten. Der Wildtyp zeigte den besten Titer, gefolgt vom Provirus „*HXsynSpe-Apa*“; der Provirus „*HXsynCla-Spe*“ war etwa doppelt so infektiös wie der Provirus „*HXsyn*“, während die Infektiösität vom Provirus „*HXsynNsp-Spe*“ nur noch halb so hoch war, wie die vom Provirus „*HXsyn*“. Damit geht die unterschiedliche Infektiösität der Previren auf ihre p24-Expression zurück. Allerdings ist die Tendenz von Titer und p24-Expression nur bei den chimären Virusmutanten untereinander annähernd linear miteinander zu vergleichen. Die bis zu 20-fach bessere p24-Expression vom Wildtyp äußert sich in einer bis zu 2000-fach besseren Infektiösität. Dies spricht dafür, dass die Replikation der chimären Previren gegenüber dem Wildtyp verzögert abläuft.

Der Unterschied zum Ergebnis aus dem „MAGI“-Assay, bei dem freigesetzte Viren aus mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* transfizierten H1299-Zellen nicht infektiös waren, kann dadurch erklärt werden, dass die Testsysteme unterschiedlich sensitiv sind. Außerdem wurden die Lymphozyten länger mit dem Kulturüberstand inkubiert und lagen in einer höheren Zellzahl vor. Es könnte daher hier möglich gewesen sein, die Summe minimal verlaufender Infektionen nachzuweisen.

### **Schlußfolgerung**

Anhand der Infektionsstudien konnte gezeigt werden, dass Proviren mit Sequenzmodifikationen am 5'-Ende von *gag* eine geringeren Infektiösität als der Wildtyp haben. Dabei korreliert die geringe Fähigkeit zur Infektion mit einer reduzierten p24-Expression. Allerdings ist die Tendenz der ermittelten infektiösen Einheiten und der p24-Produktion nur bei den chimären Previren linear miteinander vergleichbar. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Replikation der Virusmutanten verzögert abläuft. Die gestörte Virusvermehrung ist darüber hinaus auch auf einen fehlerhaften bzw. keinen Einbau von Env in die Viruspartikel zurückzuführen.

### **E.4.3. Bedeutung des Kodongebrauchs der chimären Previren für die zeitlich regulierte Replikation**

Um die Replikationskinetik der chimären Previren direkt bestimmen zu können, wurden CEM-Zellen mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe*, *HXsynSpe-Apa*, *HX10* und *HXsyn* transfiziert und über einen Zeitraum von 30 Tagen kultiviert. Dabei wurden die Zellen jeweils alle 48 Stunden 1:1 gesplittet und die p24-Expression bestimmt.

Für die chimären HI-Viren mit 5'-Sequenzmodifikationen konnte kein Replikationsverhalten nachgewiesen werden. Da die transfizierten Zellen bereits nach 48 Stunden zum

ersten Mal gesplittet wurden, steht dieses Ergebnis nicht im Widerspruch zur Titrationsanalyse. Hier kamen Kulturüberstände zum Einsatz, die erst bis zu 60 Stunden nach der Transfektion von H1299-Zellen zum Infizieren der CEM-Zellen geerntet wurden und somit mehr sezerniertes p24 angereichert hatten. Insofern ist der Unterschied zwischen den Ergebnissen der Titrationsanalyse und den der Replikationsstudie auch ein Hinweis darauf, dass die 5'-kodonmodifizierten Proviren einen sehr langsamen Vermehrungszyklus haben. Der Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ zeigte gegenüber dem Wildtyp „*HX10*“ dagegen nur eine leicht verzögerte (zwei bis vier Tage) Replikation mit reduzierten p24-Maximalwerten (ca. 60% von *HX10*-transfizierten Zellen). Somit beeinträchtigen Sequenzmodifikationen am 3'-Ende von *gag* kaum das HI-virale Replikationsverhalten. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der Studie mit den chimären *gag*-Reporterkonstrukten. Hier zeigten auch die Konstrukte mit dem 5'-Wildtyp-Anteil unter dem Einfluss der viralen *cis*-ständigen und *trans*-aktiven Elemente (*UTR-ch(1-2, 1-3)-RRE*) dieselben Expressionseigenschaften wie das *UTR-wtgag-RRE*-Plasmid.

Neben der Analyse der Replikationskinetik wurde auch das Replikationsverhalten der chimären Provirus-Varianten im „Langzeit“-Zellkulturexperiment verfolgt. Eine Steigerung der Replikationsfähigkeit in Zellkultur über die Zeit sollte mit einer Angleichung der RNA-Verteilung und einer schrittweisen Reversion der im Kodongebrauch veränderten Sequenz hin zum Wildtyp führen. Dazu wurden MT4-Zellen mit den entsprechenden Virus-Plasmiden transfiziert und über einen Zeitraum von drei Monaten kultiviert (genaue Durchführung siehe Methodenteil).

Hierbei konnte bei den Mutanten mit den 5'-Sequenzmodifikationen zu keinem Zeitpunkt p24 detektiert werden. Dies ist jetzt allerdings im Widerspruch zur Titrationsanalyse. Eine mögliche Erklärung wäre die Eigenschaft der MT4-Zellen, die sich zwar leichter als die CEM-Zellen infizieren, dafür im Gegensatz zu diesen schwerer transfizieren lassen (Erfahrungswert unserer Arbeitsgruppe). Es wurde zwar versucht, sowohl den „Kurzzeit“- als auch „Langzeit“-Versuch mit beiden Zelllinien durchzuführen, - das Problem dabei war allerdings, dass abwechselnd die MT4- oder die CEM-Zellen nicht - für Versuchszwecke optimal - zu kultivieren waren. Deshalb wurde das Replikationsverhalten nur in CEM-Zellen analysiert, während die „Langzeit“-Studie nur in MT4-Zellen durchgeführt wurde.

Nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* konnte immer eine p24-Produktion nachgewiesen werden. Diese Expressionsrate lag zwischen beiden Proviren aber über die Zeit jeweils unterschiedlich hoch zueinander, wie nachfolgender Tabelle zu entnehmen ist.

	2. Woche	3. Woche	5. Woche	8. Woche	10. Woche	12. Woche
<b>x-fach höhere p24-Expression nach Transfektion mit <i>HX10</i> ggü. <i>HXsynSpe-Apa</i>-transfizierten Zellen</b>	20,45	56,93	18,61	8,38	23,53	4,43

**Tabelle E.-5. Ermittelter Faktor zwischen der p24-Expression nach Transfektion mit *HXsynSpe-Apa* und *HX10* im Laufe der dreimonatigen Kultivierung.**

Die beobachteten Differenzen können dadurch erklärt werden, dass die beiden Proviren eine andersartige Infektiösität aufzeigen: Die Zellen werden durch den Provirus „*HX10*“ schneller infiziert als durch den Provirus „*HXsynSpe-Apa*“, und die Ausschnürung von Viruspartikeln ist höher. Deshalb kann deutlich mehr p24 bei *HX10*-transfizierten Zellen detektiert werden. Auf der anderen Seite sterben die Zellen durch den Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ langsamer ab, deshalb ist teilweise wieder ein kleinerer Unterschied in der p24-Expression zwischen beiden Proviren zu beobachten. Der Wildtyp-Virus findet zu wenig lebende Zellen um seine prozessive Replikation voranzutreiben. Nach Zugabe von frischen Zellen kommt es deshalb wieder zu einer erhöhten Vermehrung des Wildtyps, und die Differenz der p24-Produktion zum Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ wird wieder größer (siehe Zeitpunkt 3. und 10. Woche).

Nach dreimonatiger Kultivierung ging es aber beiden Zellkulturen sehr schlecht, was zum Teil auch an der Versuchsdurchführung selbst liegt. Um zu verhindern, dass replikationsfähige, aber in ihrer Vermehrung langsame Viren heraus verdünnt werden (Diese Möglichkeit bestand vor allem bei den Virusmutanten, die sich aus *HXsynCla-Spe*-, *HXsynNsp-Spe*- und *HXsyn*-transfizierten Zellen gebildet haben.), sollten a) die Zellen nicht gesplittet bzw. durch Zugabe von frischen Zellen die Zellzahl annähernd konstant gehalten und b) das Medium immer nur teilweise erneuert werden. Allerdings mußten die Zellkulturen der Viren mit 5'-Sequenzmodifikationen dann doch gesplittet werden, da keine Infektion stattfand, und die Zellen sich deshalb gut vermehrten. Zudem war es sehr schwer, eine annähernd konstante Zellzahl aufrecht zu erhalten, ohne die Zellen mit zu vielen Streßsituationen (gleichmäßige Resuspension der Zellen zum Zählen, Arbeiten unter der Sterilbank unter nicht optimalen Zellkulturbedingungen (CO<sub>2</sub>-Gehalt, Temperatur)) zu konfrontieren.

Es ist bekannt, dass die Reverse Transkriptase (RT) im zellfreien System bzw. *in vitro* eine hohe Fehlerquote beim Nukleotideinbau verursacht ( $2,5 \times 10^{-4}$  bis  $5,8 \times 10^{-4}$  (zellfreies System) bzw. ca.  $9,2 \times 10^{-4}$  (*in vitro* für HXB2 (LTR)) (zum Überblick: O'Neil *et al.*, 2002)). Deshalb sollte nach drei Monaten Kultivierung eine eventuell vorliegende Rückmutation bereits zu beobachten sein, weshalb der Versuch - auch aufgrund des schlechten Zustands der Zellen - abgebrochen wurde.

Aufgrund der statistischen Absicherung der Daten, soll hier nur auf die Analyse der Sequenzen der Proviren aus *HXsynSpe-Apa*- und *HX10*-transfizierten Zellen nach zwölfwöchiger Inkubation eingegangen werden.

Theoretisch kann es bei der HIV-Vermehrung während (i) der Transkription durch die RNA-Polymerase II, (ii) der DNA-Synthese durch die virale Reverse Transkriptase oder (iii) der Replikation durch die zelluläre DNA-Polymerase zu Mutationen in der viralen Nukleinsäuresequenz kommen. Wegen der hohen Genauigkeit während der DNA-Replikation, die nur in  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$  Fällen zu Substitutionen im Genom führt, und wegen der 3' - 5' Exonukleasen Aktivität der RNA-Polymerase II, sind die meisten Mutationen jedoch auf die Aktivität der Reversen Transkriptase zurückzuführen (O'Neil *et al.*, 2002).

Die Mutationsrate vom Provirus „*HX10*“ lag bei  $7,1 \times 10^{-4}$ , die vom Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ dagegen bei  $9,355 \times 10^{-4}$ . Damit war die Fehlerquote der RT beim *HXsynSpe-Apa*-Virus nahezu identisch mit dem in der Literatur bereits beschriebenen Wert ( $9,2 \times 10^{-4}$ , O'Neil *et al.*, 2002). Bei diesem HI-Provirus konnte zudem keine gefestigte Reversion hin zur Wildtyp-Sequenz beobachtet werden. Dies kann damit erklärt werden, dass die Replikation vom Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ gegenüber dem Wildtyp nur leicht verzögert

(zwei bis vier Tage) und die Polyproteinprozessierung fehlerfrei abläuft. Deshalb unterliegt die Virusmutante keinem eigentlichen Selektionsdruck. Die um über 20% gesteigerte Mutationswahrscheinlichkeit vom Wildtyp „*HX10*“ gegenüber dem Befund von O’Neil liegt wohl daran, dass zur Aktivität der RT auch virale und/oder zelluläre Faktoren beitragen (O’Neil *et al.*, 2002). Wegen der hohen „Durchsatzrate“ der Zellen die mit *HX10* transfiziert wurden, ging es diesen Kulturen schlechter als denen, die mit *HXsynSpe-Apa* transfiziert und inkubiert wurden. Deshalb fehlten hier für die Funktion der RT notwendige zelluläre Faktoren, wodurch die Aktivität der RT und damit ihre Mutationsrate anders war.

Die Aktivität der Reversen Transkriptase hängt aber auch von der Konformation der in cDNA zu schreibenden viralen, genomischen RNA ab (Derebail *et al.*, 2003). Darin könnte auch der Grund liegen, warum - selbst im „Langzeit“-Versuch - keine angehende Infektion nach Transfektion mit *HXsynCla-Spe*, *HXsynNsp-Spe* und *HXsyn* beobachtet werden konnte. Aufgrund der 5′-Sequenzmodifikationen wird die reverse Transkription bei diesen Virusmutanten derart behindert, so dass es zu keiner oder stark verzögerten Produktion der viralen cDNA kommt. Dies würde bedeuten, dass 5′-kodonoptimierte Proviren während ihres Replikationszykluses an unterschiedlichsten Punkten (RNA-, Protein-Prozessierung, Env-Einbau, reverse Transkription) gestört werden, die in ihrer Summe den Vermehrungszyklus zum Stoppen bringen. Die aufgrund der Sequenzmodifikationen behinderte reverse Transkription könnte auch beim Provirus „*HXsynSpe-Apa*“ der Grund für die gegenüber dem Wildtyp zeitlich verzögerte Replikation sein.

Die beobachtete G → A Mutation, die vor allem beim Wildtyp zu beobachten war, geht auf die bereits beschriebene Eigenschaft der viralen RT zurück, bevorzugt Adenosin einzubauen (Vartanian *et al.*, 1991). Bemerkenswert ist aber, dass die bekannte Transversion von C nach T nur beim chimären Provirus auftrat (Vartanian *et al.*, 1994). Eine Erklärung dafür ist bisher nicht bekannt. Beide vermehrt erscheinende Mutationen (G → A und C → T) wurden bereits von Bourara in chronisch infizierten H9-Zellen beobachtet (Bourara *et al.*, 2000).

Der Vollständigkeit halber sei hier noch erwähnt, dass mit der beschriebenen Durchführung der Genom-Analyse (Isolierung des *gag*-Gens durch PCR-Amplifikation und Subklonierung in einen Expressionsvektor zum Sequenzieren) Rekombinationsereignisse nicht erfaßt wurden.

Buck stellte bereits 2001 fest, dass eine Provirusmutante, die nicht mehr fähig ist, die verkürzte Isoform von Gag (p40) anhand AUG<sub>424</sub> mit Hilfe der *gag*-internen IRES zu bilden, eine dramatisch reduzierte Wachstumskinetik aufzeigt. Wurde dagegen p40 in *trans* zu dem Versuchsansatz gegeben, so konnte die Replikation normal ablaufen (Buck *et al.*, 2001). Geht man davon aus, dass p40 auch eine Funktion bei der HI-viralen Replikation zukommt, so liegt wohl der Verlust der Replikationsfähigkeit der Proviren „*HXsynCla-Spe*“, „*HXsynNsp-Spe*“ und „*HXsyn*“ auch am Fehlen von p40 (bereits an anderer Stelle dargestellt). Die Funktion von p40 bei der HI-viralen Replikation wird inzwischen allerdings bestritten (Brasey *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Hypothese von Buck.

### **Schlußfolgerung**

Es konnte gezeigt werden, dass chimäre Provirusmutanten, die am 5'-Ende Sequenzmodifikationen beinhalten, nicht mehr nachweisbar replizieren können. Dies kann (i) auf eine fehlerhafte Prozessierung von Gag, die zu einem gestörten bzw. keinem Einbau von Env in die korrespondierenden Viruspartikel führt basieren, (ii) auf das Fehlen des *trans*-aktiven viralen p40-Proteins begründet liegen und/oder (iii) auf eine gestörte reversen Transkription zurückgeführt werden. Der Provirus mit der kodonoptimierten Sequenz am 3'-Ende von *gag* zeigt gegenüber zum Wildtyp eine - wie bereits vermutet - nur leicht verzögerte Replikation mit einer reduzierten p24-Produktion. Damit steht dieser chimäre Provirus unter keinem Selektionsdruck, weshalb bei ihm auch keine Rückmutation zur Wildtyp-Sequenz zu beobachten ist.

## **E.5. Ausblick**

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse bilden die Basis für grundlegende Untersuchungen über die Wirkungsweise *cis*-ständiger Elemente bei der zeitlich regulierten Genexpression im Rahmen der HIV-Replikation.

### **E.5.1. Analyse der Bedeutung von Sam68 bei der Expression später HIV-1 Produkte**

Neueste Studien sprechen Sam68 immer wieder eine Bedeutung bei der HI-viralen Replikation zu (siehe Diskussion über Sam68). In dieser Arbeit wurden verschiedene neue Modelle der Beteiligung von Sam68 an der Regulation der Genexpression von HIV diskutiert. Anhaltspunkte dafür sind hauptsächlich die innerhalb von *gag* lokalisierten Bindestellen für Sam68. Bemerkenswert hierbei ist, dass diese Motive bereits 1997 von Schneider zufällig eliminiert wurden, als er versuchte, die charakteristischen Merkmale der sogenannten inhibitorischen Sequenzmotive (INS) zu analysieren (Schneider *et al.*, 1997).

Inzwischen ist gesichert, dass RNA-Synthese, -Prozessierung, -Kernexport, und -Translation eine ineinander geschachtelte Kaskade bilden, die für eine geordnete HI-virale Genexpression unabdingbar ist. Wie dieser Prozeß abläuft und kontrolliert wird, ist jedoch zum größten Teil immer noch nicht geklärt. So ist bisher auch noch nicht bekannt, welche Funktion *cis*-aktive Sequenzmotive (ineffiziente Spleißstellen und sogenannte inhibitorische Sequenzmotive) innerhalb der viralen RNA hierbei spielen. Gerade im Hinblick auf die Notwendigkeit einer zeitlich und quantitativ regulierten Proteinsynthese, wie sie für alle pathogenen Viren vorausgesetzt wird, sind detaillierte Kenntnisse dieser Mechanismen aber für die Entwicklung neuer antiviraler Therapieansätze unentbehrlich.

Der Einfluss der Sam68-Bindestellen innerhalb der viralen RNA auf die HIV-Replikation könnte anhand des *hivGFP*-Reporterkonstruktes ausgetestet werden. Hierfür müßten die UAAA-Motive innerhalb der *hivGFP*-RNA zerstört werden (**DSam68hivGFP**). Kommt Sam68 eine RNA-stabilisierende Aufgabe zu, so sollte die **DSam68hivGFP**-RNA nicht mehr im Kern degradieren. Erfüllt Sam68 dagegen eine Funktion beim Freilassen der

ungespleißten bzw. einfach gespleißten RNAs, so sollte die *UTR-~~DS~~am68hivGFP-RRE*-RNA nicht mehr (- wegen des starken 5'-SD und des schwachen 3'-SA -) effizient vom Spleißosomenkomplex freigesetzt werden können; - deshalb dürfte diese RNA auch nicht mehr transportiert werden können. Ist der Einfluss von Sam68 eher auf der Transportebene bedeutend, so dürfte die *UTR-hivGFP-RRE*-RNA schneller aus dem Kern transportiert werden als die *UTR-~~DS~~am68hivGFP-RRE*-RNA. Kommt Sam68 dagegen eine Funktion bei der Translation zu, so sollte aus *UTR-hivGFP-RRE* transfizierten Zellen das GFP-Protein früher nachzuweisen sein als aus *UTR-~~DS~~am68hivGFP-RRE* transfizierte Zellen. Desweiteren könnte mit „Band-Shift“- und „Two-Hybrid“-Analysen eine direkte Assoziierung von Sam68 mit der RNA nachgewiesen werden. Die Analyse der Bedeutung der UAAA-Motive in der viralen RNA könnte aber auch anhand anderer Rev-abhängiger Reporterkonstrukten, wie z.B. mit CAT (Rosen *et al.*, 1988, Cochrane *et al.*, 1991, Schwartz *et al.*, 1992), in gleicherweise ausgetestet werden. Mit diesen Versuchen könnte es gelingen, weitere grundlegende Einblicke in die Regulation von HIV zu bekommen. Dies würde dann möglicherweise neue therapeutische Angriffspunkte gegen HIV aufzeigen.

### ***E.5.2. Herstellung Rev-abhängiger Reporterkonstrukte durch gezielte Veränderung der Kodonwahl***

Durch die Anpassung der Kodonwahl von GFP an den Kodongebrauch von HIV-1 konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits ein Konstrukt hergestellt werden, dessen Expression der HI-viralen Regulation durch UTR und Rev/RRE unterliegt (*hivGFP*) (Sylvia Kehlenbeck, Diplomarbeit-RIMMH, 2000). Würde den Sam68-Bindestellen innerhalb der viralen RNA eine Bedeutung bei der zeitlich regulierten Genexpression im Rahmen der HIV-Replikation zukommen, so könnte man bei der Übertragung der HI-viralen Kodon-„Usage“ auf andere Gene detaillierter vorgehen. Desweiteren konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass die HI-virale Kodonwahl im 5'-Bereich eines Gens genügt, um eine Abhängigkeit von UTR und Rev/RRE zu erreichen. Diese Kenntnisse sollten bei der Entwicklung weiterer Reportersysteme zur Austestung antiviraler, auf Rev basierender Therapeutika hilfreich sein.

### ***E.5.3. Herstellung attenuierter Lebendimpfstoffe durch Veränderung der Kodonwahl***

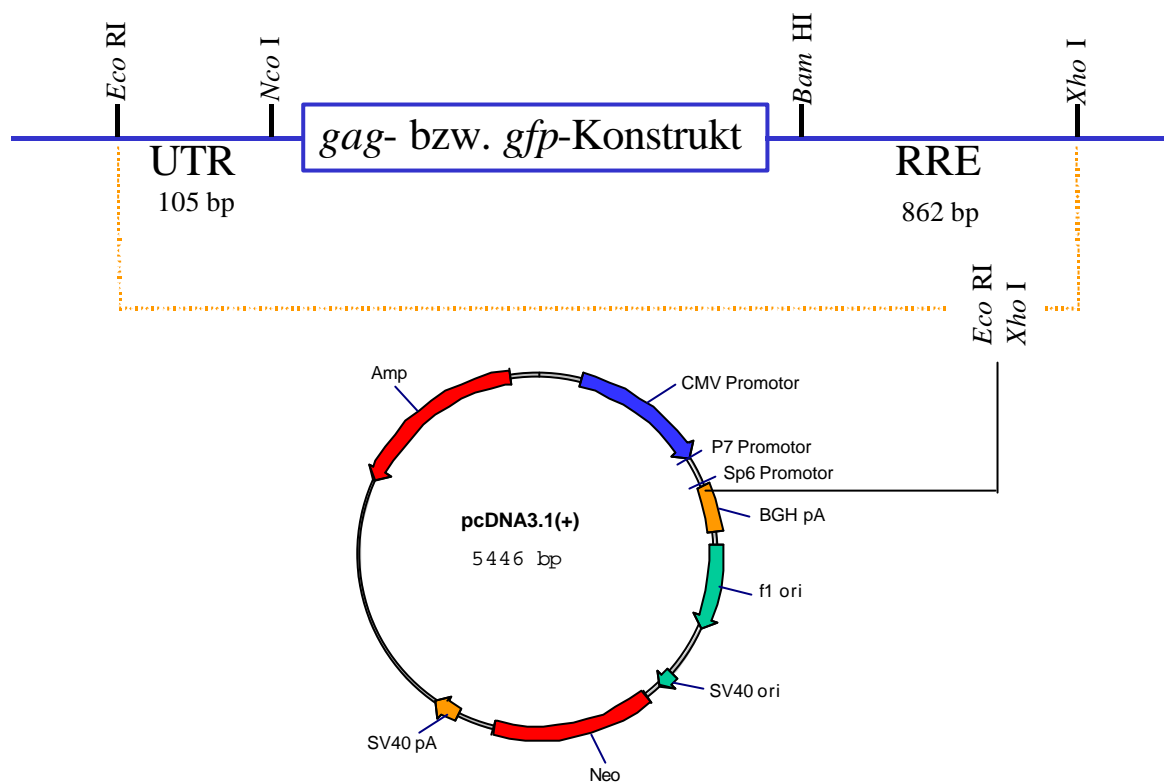
In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des 5'-Ende von *gag* für die zeitlich regulierte Expression während der HIV-Replikation dargestellt. Alle chimären Proviren mit 5'-Sequenzmodifikationen waren nicht mehr fähig zu replizieren. Diesen gegenüber zeigte die Virusmutante mit der 3'-kodonoptimierten *gag*-Sequenz gutes Infektions-, Replikations- und Virulenzverhalten.

„Lebendimpfstoffe enthalten replikationsfähige Erreger, die sich in der geimpften Person vermehren können. Das heißt, sie sind in der Lage, bestimmte Zellen zu infizieren und die Synthese von viralen Proteinen und Partikeln einzuleiten. Die so gebildeten Komponenten werden vom Immunsystem des Geimpften als „fremd“ erkannt, was die Bildung von spezifischen, neutralisierenden Antikörpern und von zytotoxischen T-Lymphozyten einleitet.“ Als Lebendimpfstoffe können attenuierte Viren dienen. Diese „... ähneln den krankheitserzeugenden Erregern in Bezug auf Aufbau, Proteinzusammensetzung und Infektionsverhalten. Sie unterscheiden sich von ihnen jedoch im Hinblick auf das Virulenzverhalten. ... Die molekulare Basis der Attenuierung sind Mutationen im Genom der Wildtypviren. ... Attenuierte Viren bergen jedoch das Risiko, dass sie im Verlauf der abgeschwächten Infektion zur Wildtypform zurück mutieren können. Deswegen achtet man heute darauf, dass die Abschwächung auf möglichst mehreren, voneinander unabhängigen Veränderungen beruht, was eine Rückmutation zum pathogenen Wildtyp weitgehend ausschließt“ (zitiert aus Modrow & Falke, Molekulare Virologie, 1997).

Damit eignen sich aber weder die hier beschriebenen 5'- noch 3'-kodonmodifizierten *gag*-Virusmutanten für den Einsatz als Lebendimpfstoffe. Basierend auf den Ergebnissen mit den chimären *gag*-Reporterkonstrukten konnte gezeigt werden, dass die Rev-Regulation auf einem Zusammenspiel *cis*-ständiger und *trans*-aktiver Elemente beruht. Desweiteren haben wohl die Bindestellen von Sam68 eine Bedeutung. Es sollte daher - basierend auf diesen Ergebnissen - möglich sein, einen attenuierten Virus herzustellen. Da die ungespleißte RNA von *HXsyn* bereits gut im Zytoplasma zu detektieren war, könnte dieses Konstrukt weiter variiert werden, um ein attenuiertes Virus herzustellen. Dazu sollten in die synthetische Sequenz zusätzlich UAAA-Motive eingebracht werden. Damit könnte eventuell eine Verzögerung der Replikation auf der Ebene des Spleißosoms erreicht werden, da die ungespleißte *HXsyn*-RNA erst freigesetzt würde, wenn genügend Sam68 herangezogen wurde. Dadurch könnte die evtl. zu langsam ablaufende Env-Expression genügend lange ablaufen, so dass ausreichend viele Env-Proteine vorhanden wären, die in den Viruspartikel eingebaut würden. Damit dürfte ein replikationsfähiger Provirus kreiert werden, der eine extrem verzögerte Vermehrungsphase - aufgrund (i) des Fehlens der *gag*-internen IRES und somit von p40 und/oder (ii) eines gestört verlaufendem Leserastersprungs zwischen *gag* und *pol* - aufzeigen sollte. Dieses sollte sich dann in einem verminderten Virulenzverhalten äußern. Aufgrund des großen Anteils an kodonmodifizierter Sequenz sollte es darüber hinaus unwahrscheinlich sein, dass dieser chimäre Virus zum Wildtyp zurück mutiert oder mit diesem rekombiniert.

## F. Anhang

### F.1. Schematische Darstellung von pcDNA3.1(+) mit den Klonierungsschnittstellen für die integrierten *gag*- bzw. *gfp*-Konstrukte und für UTR und RRE



### F.2. *gag*-Reporterkonstrukte

#### F. 2.1. Sequenz von *wtgag*

```

1 ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGG
61 TTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATATAAATTAAAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
121 CTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATA
181 CTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAAT
241 ACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT
301 TTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCT
361 GACACAGGACACAGCAGTCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGG
421 CAAATGGTACATCAGGCATATCACCTAGAACCTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAA
481 GAGAAGGCTTTTCAGCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACC
541 CCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATG
601 TTTAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTACATCCAGTGCATGCA
661 GGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACT
721 AGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAA
781 ATTTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACC
841 AGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCTTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTT
901 TATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACC
961 TTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAGCATTGGGACCAGCG
1021 GCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTAGGAGGACCCGGCCATAAGGCA
1081 AGAGTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATACAGCTACCATAATGATGCAGAGA
1141 GGCAATTTTAGGAACCAAGAAAGATGGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAGAAGGGCAC

```



```

1201 ACAGCCAGAAATTGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGA
1261 CACCAATATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC
1321 TACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATT
1381 CTTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGGTAGAG
1441 ACAACAACCTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACGTATCCTTTAACTTCC
1501 CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA

```

1539

## F. 2.2. Sequenz von *syngag* (*chgag*)

Angegeben ist die Sequenz von *syngag* und den darin zugrundeliegenden singulären Schnittstellen über die die *chgag*-Reporterkonstrukte erzeugt wurden.

```

1 ATGGGCGCCAGGGCCAGCGTGCTGAGCGGCGGCGAGCTGGACAGGTGGGAGAAGATCAGG
61 CTGAGGCGCGGCGGCAAGAAGAAGTATAAGCTGAAGCACATCGTGTGGGCCAGCAGGGAG
121 CTGGAGAGGTTTCGCCGTGAACCCCGGCCTGCTGGAGACCAGCGAGGGCTGCAGGCAGATC
181 CTGGGCCAGCTGCAGCCAGCCTGCAGACCGGCGAGGAGCTGAGGAGCCTGTACAAC
                                     StyI
                                     |
241 ACCGTGGCCACCCTGTACTGCGTGCAACAGAGGATCGAGATCAAGGACACCAAGGAGGCC
301 CTGGACAAGATCGAGGAGGAGCAGAACAAAGTCCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCCGCCGCC
361 GACACCGGCCACAGCAGCCAGGTGAGCCAGAACTACCCCATCGTGCAACATCCAGGGC
421 CAGATGGTGCACCAGGCCATCAGCCCCAGGACCTGAACGCCCTGGGTGAAGGTGGTGGAG
      StuI
      |
481 GAGAAGGCCTTCAGCCCCGAGGTGATCCCCATGTTTCAGCGCCCTGAGCGAGGGAGCCACC
541 CCCCAGGACCTGAACACCATGCTGAACACCGTGGGCGGCCACCAGGCCGCCATGCAGATG
601 CTGAAGGAGACCATCAACGAGGAGCGCCGAGTGGGACAGGGTGCACCCCGTGCACGCC
                                     SacII
                                     |
661 GGCCCCATCGCCCCCGGCCAGATGAGGGAGCCCCGCGGCGAGCAGATCGCCGGCACCACC
721 AGCACCCCTGCAGGAGCAGATCGGCTGGATGACCAACAACCCCCCATCCCGTGGGCGAA
781 ATCTACAAGAGGTGGATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGAGGATGTACAGCCCCACC
      EcoRV
      |
841 AGCATCCTGGATATCAGGCAGGGCCCCAAAGAGCCCTTCAGGGACTACGTGGACAGGTTT
901 TACAAGACCCTGCGCGCCGAGCAGGCCAGCCAGGAGGTGAAGAACTGGATGACCGAGACC
961 CTGCTGGTGCAGAACGCCAACCCCGACTGCAAGACCATCCTGAAGGCCCTGGGACCCGCC
1021 GCCACCCCTGGAGGAGATGATGACCGCCTGCCAGGGCGTGGGCGGCCCGGCCACAAGGCC
      BstEII
      |
1081 AGGGTGCTGGCCGAGGCCATGAGCCAGGTGACCAACACCGCCACCATCATGATGCAGAGG
1141 GGCAACTTCAGGAACCAGAGGAAGATGGTGAAGTGCTTCAACTGCGGCAAGGAGGGCCAC
1201 ACCGCCAGAACTGCCGCGCCCCCAGGAAGAAGGGCTGCTGGAAGTGCGGCAAGGAGGGC
                                     BglIII
                                     |
1261 CACCAGATGAAGGACTGCACCGAGAGGCAGGCCAACTTCTGGGCAAGATCTGGCCCAGC
1321 TACAAGGGCAGGCCCGGCAACTTCTGCAGAGCAGGCCCGAGCCCACCGCCCCCCCCCTTC
1381 CTGCAGAGCAGGCCCGAGCCCACCGCCCCCCCCGAGGAGAGCTTCAGGAGCGGCGTGGAG
1441 ACCACCACCCCCCCCCAGAAGCAGGAGCCCATCGACAAGGAGCTGTACCCCTGACCAGC
1501 CTGAGGAGCCTGTTTCGGCAACGACCCAGCAGCCAGTGA

```

1539

Sequenzvergleich zwischen *syngag* und *wtgag*; - über die zuvor angegeben singulären Schnittstellen von *syngag* können die *chgag* Sequenzen rekonstruiert werden:

```

syngag 1 ATGGGCGCCAGGGCCAGCGTGCTGAGCGGCGGCGAGCTGGACAGGTGGGA 50
        ||||| || || || || || || || || || || || || || || || ||
wtgag 1 ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAAGATTAGATCGATGGGA 50
        .
51 GAAGATCAGGCTGAGGCCCGGCGGCAAGAAGAAGTATAAGCTGAAGCACA 100
        || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
51 AAAAATTTCGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAAACATA 100
        .
101 TCGTGTGGGCCAGCAGGGAGCTGGAGAGGTTTCGCCGTGAACCCCGGCCTG 150
        || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
101 TAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGACAGTTAATCCTGGCCTG 150

```

```

151 CTGGAGACCAGCGAGGGCTGCAGGCAGATCCTGGGCCAGCTGCAGCCCAG 200
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
151 TTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATC 200

201 CCTGCAGACCGGCAGCGAGGAGCTGAGGAGCCTGTACAACACCGTGGCCA 250
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
201 CCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAA 250

251 CCCTGTACTGCGTGCACCAGAGGATCGAGATCAAGGACACCAAGGAGGCC 300
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
251 CCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT 300

301 CTGGACAAGATCGAGGAGGAGCAGAACAAAGTCCAAGAAGAAGGCCAGCA 350
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
301 TTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCA 350

351 GGCCGCGCGCCGACACCGGCCACAGCAGCCAGGTGAGCCAGAACTACCCCA 400
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
351 AGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAGTCAGGTCAGCCAAAATTACCCTA 400

401 TCGTGCAGAACATCCAGGGCCAGATGGTGCACCAGGCCATCAGCCCCAGG 450
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
401 TAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGA 450

451 ACCCTGAACGCCTGGGTGAAGGTGGTGGAGGAGAAGGCCTTCAGCCCCGA 500
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
451 ACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGA 500

501 GGTGATCCCCATGTTTCAGCGCCCTGAGCGAGGGAGCCACCCCCAGGACC 550
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
501 AGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCCAAGATT 550

551 TGAACACCATGCTGAACACCGTGGGCGGCCACCAGGCCGCCATGCAGATG 600
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
551 TAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATG 600

601 CTGAAGGAGACCATCAACGAGGAGGCCGCGAGTGGGACAGGGTGCACCC 650
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
601 TTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTACATCC 650
651 CGTGCACGCGCGCCCCATCGCCCCCGGCCAGATGAGGGAGCCCCGCGGCA 700
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
651 AGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAA 700

701 GCGACATCGCCGGCACCACCAGCACCCTGCAGGAGCAGATCGGCTGGATG 750
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
701 GTGACATAGCAGGAACACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATG 750

751 ACCAACAACCCCCCATCCCCGTGGGCGAAATCTACAAGAGGTGGATCAT 800
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
751 ACAAATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATAAT 800

801 CCTGGGCCTGAACAAGATCGTGAGGATGTACAGCCCCACCAGCATCCTGG 850
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
801 CCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGG 850

851 ATATCAGGCAGGGCCCCAAAGAGCCCTTCAGGGACTACGTGGACAGGTTTC 900
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
851 ACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCTTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTC 900

901 TACAAGACCCTGCGCGCCGAGCAGGCCAGCCAGGAGGTGAAGAACTGGAT 950
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
901 TATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGAT 950

951 GACCGAGACCCTGCTGGTGCAGAACGCCAACCCCGACTGCAAGACCATCC 1000
    ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
951 GACAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCAGATTGTAAGACTATTT 1000

```

```

1001 TGAAGGCCCTGGGACCCGCCACCCTGGAGGAGATGATGACCGCCTGC 1050
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1001 TAAAAGCATTTGGGACCAGCGGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGT 1050

1051 CAGGGCGTGGGCGGCCCGGCCACAAGGCCAGGGTGCTGGCCGAGGCCAT 1100
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1051 CAGGGAGTAGGAGGACCCGCCATAAGGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAAT 1100

1101 GAGCCAGGTGACCAACACCGCCACCATCATGATGCAGAGGGGCAACTTCA 1150
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1101 GAGCCAAGTAACAAATACAGCTACCATAATGATGCAGAGAGGCAATTTTA 1150

1151 GGAACCAGAGGAAGATGGTGAAGTGCTTCAACTGCGGCAAGGAGGGCCAC 1200
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1151 GGAACCAAAGAAAGATGGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCAC 1200

1201 ACCGCCAGGAACTGCCGCGCCCCCAGGAAGAAGGGCTGCTGGAAGTGC GG 1250
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1201 ACAGCCAGAAATTGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGG 1250

1251 CAAGGAGGGCCACCAGATGAAGGACTGCACCGAGAGGCAGGCCAACTTCC 1300
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1251 AAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTT 1300

1301 TGGGCAAGATCTGGCCCAGCTACAAGGGCAGGCCCGGCAACTTCCTGCAG 1350
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1301 TAGGGAAGATCTGGCCTTCCTACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAG 1350

1351 AGCAGGCCCGAGCCCACCGCCCCCCTTCCTGCAGAGCAGGCCCGAGGCC 1400
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1351 AGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATTCTTCAGAGCAGACCAGAGGCC 1400

1401 CACCGCCCCCCCCGAGGAGAGCTTCAGGAGCGGCGTGGAGACCACCACCC 1450
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1401 AACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGGTAGAGACAACAATC 1450

1451 CCCCCCAGAAGCAGGAGCCCATCGACAAGGAGCTGTACCCCTGACCAGC 1500
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1451 CCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAACTTCC 1500

1501 CTGAGGAGCCTGTTTCGGCAACGACCCAGCAGCCAGTGA 1539 syngag
    || || || || || || || || || || || || || || || ||
1501 CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA 1539 wtgag

```

### F.3. *gfp*-Reporterkonstrukte

#### F. 3.1. Sequenz von *huGFP*

siehe Diplomarbeit Sylvia Kehlenbeck, RIMMH 2000

#### F. 3.2. Sequenz von *hivGFP*

siehe Diplomarbeit Sylvia Kehlenbeck, RIMMH 2000

**F. 3.3. Sequenz von DsdGFP**

```

1  ATGGTTTCCA AGGGCGAGGA ATTATTTACA GGAGTAGTAC CAATACTCGT
51  AGAATTAGAC GGAGACGTCA ACGGACATAA ATTTTCCGTT AGCGGAGAGG
101 GAGAGGGGAGA TGCAACATAT GGAAACTAA CATTAAAAAT TATATGTACA
151 ACCGGAAGAAC TACCAGTTCC TTGGCCTACA TTAGTAACAA CATTTCACATA
201 TGGAGTACAA TGT'TTTAGCA GATATCCAGA CCATATGAAA CAACATGATT
251 TTTTAAAAAG CGCAATGCCA GAGGGATATG TACAAGAGCG AACAAATATT
301 TTTAAAGACG ACGGAAATTA TAAAACACGA GCAGAGGTCA AATTCGAGGG
351 TGACACACTC GTTAACAGAA TAGAATTAAA AGGAATAGAC TTAAAGGAAG
401 ATGGAAATAT ACTCGGACAT AAACCTCGAAT ACAATTATAA TAGCCATAAT
451 GTTTATATAA TGGCAGACAA AAAAAAAAT GGTATAAAAG TCAACTTTAA
501 AATTAGACAT AATATTGAAG ATGGATCAGT ACAATTAGCA GACCATTATC
551 AACAAAATAC ACCAATAGGA GACGGACCAG TATTATTACC AGACAATCAT
601 TATTTAAGCA CACAAAGCGC CCTCTCCAAA GACCCAAATG AAAAAAGAGA
651 CCATATGGTT TTATTAGAAT TTGTAACAGC TGCAGGAATA ACACCTCGGT
701 TGGACGAATT ATATAAATAA

```

720

**F. 3.4. Sequenz von e1GFP**

```

1  ATGGTAAGCA AGGGGGAGGA ACTCTTTACT GGTGTTGTAC CCATCCTAGT
51  CGAGTTAGAT GGTGACGTCA ACGGTCACAA ATTCTCAGTC TCTGGAGAAG
101 GAGAGGGTGA CGCAACTTAT GGGAAGCTCA CACTTAAATT CATTGTACATA
151 ACCGGGAAGC TGCCGTGTTCC TTGGCCGACC CTCGTGACTA CGTTTACGTA
201 CGGCGTGCAG TGCTTCTCTC GGTATCCTGA TCACATGAAG CAACACGATT
251 TCTTCAAGTC CGCTATGCCC GAGGGGTATG TACAAGAACG TACAATATTT
301 TTCAAGGATG ACGGTAATTA CAAGACTAGG GCTGAGGTCA AGTTTGAGGG
351 GGATACGTTG GTAAATCGCA TTGAACTAAA GGGCATAGAT TTCAAAGAGG
401 ATGGAAACAT ATTAGGGCAC AAGCTGGAGT ACAATTACAA TTCACACAAT
451 GTTTACATTA TGGCCGACAA ACAGAAAAAC GGGATCAAAG TTAACCTCAA
501 GATCCGACAT AACATCGAAG ATGGTAGCGT GCAATTGGCG GACCATTACC
551 AACAGAACAC ACCAATCGGT GACGGCCCAG TGTGCTGCC AGACAATCAT
601 TATTTATCGA CCCAGTCGGC CTTGAGTAAA GATCCGAATG AGAAGAGAGA
651 TCATATGGTT CTATTAGAGT TTGTAACCGC GGCCGGCATC ACGCTTGGGA
701 TGGACGAACT TTATAAGTAA

```

720

**F. 3.5. Sequenz von e2GFP**

```

1  ATGGTCAGTA AAGGGGAGGA GTTGTTACAG GGGGTGGTTC CCATATTAGT
51  CGAGTTAGAC GGGGACGTGA ATGGACATAA GTTCTCAGTC TCTGGTGAGG
101 GGGAGGGGGA CGCCACGTAT GGGAAGCTAA CGTGAAATT CATTTCACAG
151 ACCGGGAAGC TCCCCGTACC TTGGCCAACT TTGGTTACGA CATTACCTA
201 CGGGGTGCAG TGCTTCTCAA GATACCCAGA CCACATGAAA CAGCATGACT
251 TCTTCAAAAG TGCCATGCCG GAGGGATACG TGCAAGAGCG TACAATCTTC
301 TTCAAGGACG ACGGTAATTA TAAGACACGG GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG
351 GGACACCCTA GTGAACCGCA TTGAGCTAAA AGGGATTGAC TTCAAGGAGG
401 ACGGCAACAT CCTAGGCCAC AAACCTAGAGT ACAACTATAA TTCTCACAAT
451 GTATATATCA TGGCCGACAA ACAGAAGAAC GGAATAAAGG TTAATTTCAA
501 AATAAGGCAT AACATCGAGG ACGGGAGCGT ACAGCTTGCC GACCACTATC
551 AGCAGAACAC GCCTATAGGT GACGGTCCCG TTCTACTACC GGACAATCAT
601 TACCTGTCCA CTCAGAGCGC CCTTTCGAAA GACCCGAACG AGAAGCGAGA
651 CCATATGGTA CTATTAGAGT TCGTGACGGC CGCCGGCATC ACTCTAGGGA
701 TGGACGAGCT GTATAAGTAA

```

720

**F. 3.6. Sequenz von e3GFP**

```

1  ATGGTGTCTA AGGGCGAGGA GCTATTCACG GGGGTGGTGC CGATCCTAGT
51  GGAGCTAGAC GGGGACGTGA ACGGGCATAA ATTACAGCTG AGTGGGGAGG
101 GGGAGGGTGA CGCCACGTAC GGAAAGCTAA CGCTAAAAAT CATCTGCACG
151 ACGGGGAAGC TACCGGTGCC GTGGCCGACG CTAGTGACGA CGTTTCACGTA
201 CGGGGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCGGA CCACATGAAG CAACACGACT
251 TCTTCAAGAG CGCCATGCCC GAGGGGTACG TGCAGGAGAG AACGATCTTC
301 TTCAAGGACG ACGGGAATTA CAAGACGAGG GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG

```

```

351 GGACACGCTA GTGAATCGGA TCGAGCTAAA AGGGATTGAC TTCAAGGAGG
401 ACGGGAATAT TCTAGGGCAT AAGCTAGAGT ACAATTACAA CTCACACAAT
451 GTGTACATCA TGGCCGACAA ACAGAAAAAT GGGATCAAGG TGAATTTCAA
501 GATACGTCAC AACATCGAGG ACGGGTCGGT GCAGCTAGCC GACCACTACC
551 AGCAGAACAC GCCGATCGGG GACGGGCCGG TGCTACTACC GGACAACCAC
601 TACCTAAGCA CGCAGAGTGC CCTATCCAAG GACCCGAACG AGAAGAGGGA
651 CCACATGGTG CTACTAGAGT TCGTGACGGC CGCCGGGATA ACGCTAGGGA
701 TGGACGAGCT ATACAAGTAA

```

720

### F. 3.7. Sequenz von *cuGFP*

```

1 ATGGTGTCTA AGGGAGAGGA GCTGTTTACA GGAGTGGTGC CTATCTGGT
51 GGAAC TGGAC GGAGACGTGA ACGGACACAA GTTCTCTGTG TCTGGAGAGG
101 GAGAAGGAGA CGCCACATAT GGAAAGCTGA CACTGAAGTT CATCTGCACA
151 ACAGGAAAGC TGCCTGTGCC TTGGCCTACA CTGGTGACAA CATTACATA
201 TGGAGTGCAG TGCTTCTCTC GCTACCCTGA CCATATGAAG CAGCAGGACT
251 TCTTCAAGTC TGCCATGCCT GAGGGATACG TGCAGGAGCG CACCATCTTC
301 TTTAAGGACG ACGGCAACTA TAAGACACGC GCCGAAGTGA AGTTCGAGGG
351 AGACACACTG GTGAACCGCA TCGAACTGAA GGAATCGAC TTCAAGGAGG
401 ACGGAAACAT CCTGGGACAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CTCTCACAAC
451 GTGTATATTA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGAATCAAGG TGAAC TTCAA
501 GATCCGGCAC AACATCGAGG ACGGATCTGT GCAGCTGGCC GACCACTATC
551 AGCAGAACAC ACCTATTGGA GACGGACCTG TGCTGCTGCC TGACAACCAC
601 TACCTGTCTA CACAGTCTGC CCTGTCTAAG GACCCTAACG AAAAGCGCGA
651 CCATATGGTG CTGCTGGAGT TCGTGACAGC CGCCGGAATC ACACTGGGAA
701 TGGACGAGCT GTATAAGTAA

```

720

## F.4. HI-virale, *cis*-aktive Elemente

### F. 4.1. Sequenz von *UTR*

Die 5'-Spleißdonorstelle von HIV-1 ist mit fester Schrift hervorgehoben.

```

1 CGACGCAGGA CTCGGCTTGC TGAAGCGCGC ACGGCAAGAG GCGAGGGGCG
51 GCGACTGGTG AGTACGCCAA AAATTTTGAC TAGCGGAGGC TAGAAGGAGA
101 GAGCC

```

105

### F. 4.2. Sequenz von *RRE*

```

1 GAGATCTTCA GACCTGGAGG AGGAGATATG AGGGACAATT GGAGAAGTGA
51 ATTATATAAA TATAAAGTAG TAAAAAATTGA ACCATTAGGA GTAGCACCCA
101 CCAAGGCAAA GAGAAGAGTG GTGCAGAGAG AAAAAAGAGC AGTGGGAATA
151 GGAGCTTTGT TCCTTGGGTT CTTGGGAGCA GCAGGAAGCA CTATGGGCGC
201 AGCGTCAATG ACGCTGACGG TACAGGCCAG ACAATTATTG TCTGGTATAG
251 TGCAGCAGCA GAACAATTTG CTGAGGGCTA TTGAGGCGCA ACAGCATCTG
301 TTGCAACTCA CAGTCTGGGG CATCAAGCAG CTCCAGGCAA GAATCCTGGC
351 TGTGGAAAGA TACCTAAAGG ATCAACAGCT CCTGGGGATT TGGGGTTGCT
401 CTGGAAAACCT CATTTGCACC ACTGCTGTGC CTTGGAATGC TAGTTGGAGT
451 AATAAATCTC TGGAACAGAT TTGGAATAAC ATGACCTGGA TGGAGTGGGA
501 CAGAGAAATT AACAAATTACA CAAGCTTAAT ACACTCCTTA ATTGAAGAAT
551 CGCAAAACCA GCAAGAAAAG AATGAACAAG AATTATTGGA ATTAGATAAA
601 TGGGCAAGTT TGTGGAATTG GTTTAACATA ACAAATTGGC TGTGGTATAT
651 AAAATTATTC ATAATGATAG TAGGAGGCTT GGTAGGTTTA AGAATAGTTT
701 TTGCTGTACT TTCTGTAGTG AATAGAGTTA GGCAGGGATA TTCACCATTA
751 TCGTTTCAGA CCCACCTCCC AATCCCAGG GGACCCGACA GGCCCGAAGG
801 AATAGAAGAA GAAGGTGGAG AGAGAGACAG AGACAGATCC ATTCGATTAG
851 TGAACGGATC CT

```

862

## F.5. HIV-1-Proviruskonstrukte

### F. 5.1. Sequenz von pHX10

Das Plasmid pHX10 enthält die provirale Sequenz von BH10 (*accession number*: M15654) mit den flankierenden LTR-Regionen des Isolates HXB2 (Ratner *et al.*, 1987).

### F. 5.2. gag-Sequenz von HXsynCla-Spe, HXsynNsp-Spe, HXsynSpe-Apa

Als Matrize der Klonierungen der chimären Proviren diente das Plasmid pHX10 (siehe G.5.1.). Angegeben ist die Sequenz von *wtgag* und den darin zugrundeliegenden singulären Schnittstellen über die die chimären Proviren erzeugt wurden.

Mit dem zuvor angegebenen Sequenzvergleich zwischen *syngag* und *wtgag* können die chimären proviralen *gag*-Sequenzen rekonstruiert werden.

```

                                ClaI
                                |
1  ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGG
61  TTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATATAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
121 CTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATA

                                NspV
                                |
                                TTCGAA
181 CTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTTAGATCATTATATAAT
241 ACAGTAGCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT
301 TTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCT
361 GACACAGGACACAGCAGTCAGGTCAGCCAAAATTACCTTATAGTGCAGAACATCCAGGGG
421 CAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAA
481 GAGAAGGCTTTTCAGCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACC
541 CCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAATG
601 TTAAGAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTACATCCAGTGCATGCA

                                SpeI
                                |
661 GGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACACTACT
721 AGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAA
781 ATTTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACC
841 AGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCTTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTTC
901 TATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATGGATGACAGAAACC
961 TTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAGCATTTGGGACCAGCG
1021 GCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTAGGAGGACCCGGCCATAAGGCA
1081 AGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATACAGCTACCATAATGATGCAGAGA
1141 GGCAATTTTAGGAACCAAGAAAGATGGTTAAGTGTTCATTTGTGGCAAGAAGGGCAC

                                ApaI
                                |
1201 ACAGCCAGAAATTGCAGGGCCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGA
1261 CACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCC
1321 TACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCATTT
1381 CTTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGGTAGAG
1441 ACAACAACCTCCCCCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAACTTCC
1501 CTCAGATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA

```

1539

### F. 5.3. Sequenz von HXsyngagpol (HXsyn)

siehe Doktorarbeit Marcus Graf, RIMMH 2000

## F.6. Überblick über die Anzahl und Art der Spleißstellen in *huGFP*, *hivGFP* und *DsdGFP*

	<b>kon-SD1</b>	<b>kon-SD2</b>	<b>kon-SD3</b>	<b>kon-SD4</b>	<b>5-sd</b>	<b>3-sd</b>
<i>huGFP</i>	0-0-0-26	0-0-6-18	0-0-7-16	0-2-5-24	0-2-2-21	0-0-6-35
<i>hivGFP</i>	0-1-5-39	0-0-4-23	0-2-17-46	0-1-11-40	0-0-1-11	0-1-8-46
<i>DsdGFP</i>	0-0-0-34	0-0-0-26	0-0-3-40	0-0-5-32	0-0-0-9	0-0-1-44
	<b>pur-krypSD</b>	<b>bor-krypSD</b>	<b>5sd-oreilly</b>	<b>3ss-oreilly</b>		
<i>huGFP</i>	0-0-9-25	0-0-3-27	0-2-14-41	2-14-27-23		
<i>hivGFP</i>	0-3-7-28	0-0-0-8	0-4-24-81	1-10-26-20 +1		
<i>DsdGFP</i>	0-0-3-31	0-0-2-19	0-0-8-79	3-10-25-20 +1		
	<b>SD1-HIV</b>	<b>SD2-HIV</b>	<b>SD3-HIV</b>	<b>SD5-HIV</b>		
<i>huGFP</i>	0-2-2-21	2-4-15-33	0-0-1-28	0-0-6-35		
<i>hivGFP</i>	0-0-1-11	3-3-9-50	0-0-12-70	0-1-8-47		
<i>DsdGFP</i>	0-0-0-9	0-0-16-41	0-0-3-50	0-0-1-44		
	<b>SS2-HIV</b>	<b>SS4a-HIV</b>	<b>SS4b-HIV</b>	<b>SS5-HIV</b>	<b>SS7a-HIV</b>	<b>SS7b-HIV</b>
<i>huGFP</i>				0-0-0-4		
<i>hivGFP</i>	0-0-0-1	0-0-0-2	0-0-0-1		0-0-0-3	0-0-0-1
<i>DsdGFP</i>	0-0-0-2		0-0-0-1		0-0-0-1	0-0-0-1
	<b>5sd-m2</b>	<b>5sd-m3</b>	<b>5sd-m4</b>	<b>5sd-m5</b>		
<i>huGFP</i>	0-1-9-27	0-0-6-21	0-0-4-14	0-0-4-10		
<i>hivGFP</i>	0-2-10-57	0-1-8-36	0-1-4-24	0-1-3-16		
<i>DsdGFP</i>	0-0-3-55	0-0-3-34	0-0-2-15	0-0-1-12		

**Gegenüberstellung der Anzahl und Art der Spleißstellen von *huGFP*, *hivGFP* und *DsdGFP*.** Um als Spleißstelle von den Spleißfaktoren erkannt zu werden reichen teilweise nur fünf Übereinstimmungen der DNA-Basen zur 9 bp-großen „konsensus“ Spleißstellensequenz aus (5/9). Die Zahl an erster Position bezeichnet die Anzahl der gefundenen Spleißstellen mit einer einzigen falschen Übereinstimmung zur angegebenen Sequenz (Sequenzen siehe nachfolgend). Die Zahl an zweiter Position bezeichnet die Anzahl der gefundenen Spleißstellen mit zwei falschen Übereinstimmungen zur angegebenen Sequenz. Die Zahl an dritter Position bezeichnet die Anzahl der gefundenen Spleißstellen mit drei falschen Übereinstimmungen zur angegebenen Sequenz. Die Zahl an vierter Position bezeichnet die Anzahl der gefundenen Spleißstellen mit vier falschen Übereinstimmungen zur angegebenen Sequenz. kon = konsensus, kryp = kryptisch, sd/SD = Spleißdonor, SS = Spleißakzeptorstelle von HIV-1, pur bezeichnet die von Purcell identifizierte „kryptische“ Spleißstelle, bor bezeichnet die von Borg identifizierte „kryptische“ Spleißstelle, oreilly bezeichnete die von O'Reilly beschriebenen Spleißstellen. Die mit HIV gekennzeichneten Motive sind die Schnittstellen von HIV-1 mit ihrer in der Literatur bekannten Nummerierung.

kon-SD1 = 5'-caggttaagt-3', kon-SD2 = 5'-caggtgagt-3', kon-SD3 = 5'-aaggttaagt-3', kon-SD4 = 5'-aaggtgagt-3', 5-sd = 5'-ctggtgagt-3', 3-sd = 5'-actcaccag-3', pur-krypSD = 5'-agagtacgc-3', bor-krypSD = 5'-tggtgcga-3', 5sd-oreilly = 5'-maggttagt-3', 3ss-oreilly = 5'-ynyagg-3', SD1-HIV = 5'-ctggtgagt-3', SD2-HIV = 5'-aaggtgaag-3', SD3-HIV = 5'-aaggttaga-3', SD5-HIV = 5'-gcagtaagt-3', SS2-HIV = 5'-gggtttattacagg-3', SS4a-HIV = 5'-ttcataacaaaagc-3', SS4b-HIV = 5'-aacaaaagcttagg-3', SS5-HIV = 5'-tctcctatggcagg-3', SS7a-HIV = 5'-tgaatagagttagg-3', SS7b-HIV = 5'-tagagttaggcagg-3', 5sd-m2 = 5'-mmaggttagt-3', 5sd-m3 = 5'-mmmaggttagt-3', 5sd-m4 = 5'-mmmmaggttagt-3', 5sd-m5 = 5'-mmmmmmaggttagt-3' (y = c/t, m = c/a, r = a/g). +1 bedeutet, dass hier die entsprechende „konsensus“ Spleißstellensequenz existiert. (zum Überblick: Borg *et al.*, 1999, O'Reilly *et al.*, 1995)

## G. Literaturverzeichnis

- Afonina, E., Neumann, N. and Pavlakis, G. N. (1997). Preferential binding of poly(A) binding protein 1 (PABP1) to an inhibitory RNA element in the HIV-1 gag mRNA. *J. Biol. Chem.* **272**: 2307-2311.
- Akkina, R. K., Walton, R. M. Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V. and Chen, Il S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a HIV-1 based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.* **70**: 2581-2585.
- Amendt, B.A., Hesslein, D., Chang, L.J. and Stoltzfus, M. (1994). Presence of negative and positive *cis*-acting RNA splicing elements within and flanking the first *tat* coding exon of HIV-1. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 3960-3970.
- Amendt, B.A., Si, Z.H. and Stoltzfus M. (1995). Presence of Exon Splicing Silencer within HIV-1 *tat* Exon 2 and *tat-rev* Exon 3: Evidence for Inhibition Mediated by Cellular Factors. *Molecular and Cellular Biology* **15** (8): 4606-4615.
- Arrigo, S. J. and Chen, I. S. (1991). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes Dev.* **5**: 808-819.
- Barksdale S.K. and Baker, C.C. (1995). The HIV-1 Rev protein and the Rev-responsive element counteract the effect of an inhibitory 5' splice site in a 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* **15**: 2962-2971.
- Berthold, E. & Maldarelli, F. (1996). Cis-acting elements in HIV-1 RNAs direct viral transcripts to distinct intranuclear locations. *J. Virol.* **70**: 4667-4682.
- Bevec, D., Jaksche, H., Oft, M., Wöhl, T., Himmelsbach, M., Pacher, A., Schebesta, M., Koettnitz, K., Dobrovnik, M., Csonga, R., Lottspeich, F. and Hauber, J. (1996). Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science*, **271**: 1858-1860.
- Bilodeau, P.S., Domsic, J.K., Mayeda, A., Krainer, A.R. and Stoltzfus, C.M. (2001). RNA Splicing at HIV-1 3' Splice Site A2 Is Regulated by Binding of hnRNP A/B Proteins to an Exonic Splicing Silencer Element. *J. Virol.* **75** (18): 8487-8497.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **7** (6): 1513-1523.
- Bogerl, H. P., Fridell, R.A., Madore, S. and Cullen, B. R. (1995). Identification of a novel cellular co-factor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell*, **82**: 485-494.
- Bojak, A. (1998). Bedeutung von Spleißstellen und inhibitorischen Sequenzen für die Rev/RRE-abhängige Expression des HIV-1 Pr55<sup>gag</sup>-Polyproteins (Diplomarbeit - RIMMH, AG Wagner, Regensburg).
- Bojak, A. (2001). Strategien zur Optimierung von DNA-Vakzine Kandidaten gegen das humane Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1) (Doktorarbeit - RIMMH, AG Wagner, Regensburg).
- Borg, K. M., Favaro, J. P., Arrigo, S. J. and Schmidt, M. (1999). Activation of a Cryptic Splice Donor in HIV-1. *J Biomed Sci*, **6**: 45-52.
- Borg, K. T., Favaro, J. P. and Arrigo, S. J. (1997). Involvement of HIV-1 Splice Sites in the Cytoplasmic Accumulation of Viral RNA. *Virology* **236**: 95-103.



- Boris-Lawrie, K., Roberts, T. M. and Hull, S. (2001). Retroviral RNA elements integrate components of post-transcriptional gene expression. *Life Sciences* **69**: 2697-2709.
- Bourara, K., Litvak, S. and Araya, A. (2000). Generation of G-to-A and C-to-U Changes in HIV-1 Transcripts by RNA Editing. *Science* **289**: 1564-1566.
- Brasey, A., Lopez-Latra, M., Ohlmann, T., Beerens, N., Berkhout, B., Darlix, J.L. and Sonenberg, N. (2003). The Leader of HIV-1 Genomic RNA Harbors an Internal Ribosome Entry Segment That Is Active during the G<sub>2</sub>/M Phase of the Cell Cycle. *J. Virol.* **77** (7): 3939-3949.
- Brighty, D. and Rosenberg, M. (1994). A cis-acting repressive sequence that overlaps the RRE of HIV-1 regulates nuclear retention of env mRNAs independently of known splice signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 8314-8318.
- Buck, C.B., Shen, X., Egan, M.A., Pierson, T.C., Walker, C.M. and Siliciano, R.F. (2001). The HIV-1 *gag* Gene Encodes an Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.* **75** (1): 181-191.
- Caputi, M. and Zahler, M. (2002). SR proteins and hnRNP H regulate the splicing of the HIV-1 *tev*-specific exon 6D. *EMBO* **21** (4): 845-855.
- Carr, J.K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Artenstein, A. W., Hegerich, P.A., St Louis, D., Burke, D. S. and McCutchan, F. E. (1996). Full-length sequence and mosaic structure of a HIV-1 isolate from Thailand. *J. Virol.* **70**: 789-795.
- Chang, D.D. and Sharp, P.A. (1989). Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* **59**: 789-795.
- Chen, C. Y. and Shyu, A. B. (1995 a). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *TIBS* **20**: 465-471 - Elsevier Science Ltd.
- Chen, C.Y., Xu, N. and Shyu, A.B. (1995 b). mRNA Decay Mediated by Two Distinct AU-Rich Elements from c-fos and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Transcripts: Different Deadenylation Kinetics and Uncoupling from Translation. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. **15** (10): 5777-5788.
- Chinnasamy, D., Chinnasamy, N., Enriquez, M. J., Otsu, M., Morgan, R. A. and Candotti, F. (2000). Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood* **96**, 1309-1316.
- Chinnasamy, N., Chinnasamy, D., Toso, J. F., Lapointe, R., Candotti, F., Morgan, R. A. and Hwu, P. (2000). Efficient gene transfer to human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells using HIV-1 based lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **11**: 1901-1909.
- Cochrane, A. W., Jones, K. S., Beidas, S., Dillon, P. J., Skalka, A. M. and Rosen, C. A. (1991). Identification and characterization of intragenic sequences which repress HIV structural gene expression. *J. Virol.* **65**: 5305-5313.
- Collier, B., Öberg, D., Zhao, X. and Schwartz, S. (2002). Specific Inactivation of Inhibitory Sequences in the 5' End of the HPV-16 L1 Open Reading Frame Results in Production of High Levels of L1 Protein in Human Epithelial Cells. *J. Virol.* **76** (6): 2739-2752.
- Condra, J. H., Miller, M. D., Hazuda, D. J. and Emini, E. A. (2002). Potential New Therapies for the Treatment of HIV-Infection. *Annu. Rev. Med.* **53**: 541-55.
- Corbet, S., Muller-Trutwin, M. C., Versmisse, P., Delarue, S., Ayoub, A., Lewis, J., Brunak, S., Martin, P., Brun-Vezinet, F., Simon, F., Barre-Sinoussi, F. and Maucel, P. (2000). Env

Sequences of SIV from Chimpanzees in Cameroon are Strongly Related to those of HIV Group N from the same Geographic Area. *J. Virol.* **74**(1): 529-534.

Coyle, J.H., Guzik, B. W., Bor, Y.C., Jin, L., Eisner-Smerage, L., Taylor, S.J., Rekosh, D. and Hammariskjöld, M.L. (2003). Sam68 Enhances the Cytoplasmic Utilization of Intron-Containing RNA and Is Functionally Regulated by the Nuclear Kinase Sik/BRK. *Molecular and Cellular Biology* **23** (1): 92-103.

Cui, Y., Iwakuma, T. and Chang, L.J. (1999). Contributions of Viral Splice Sites and *cis*-Regulatory Elements to Lentivirus Vector Function. *J. Virol.* **73** (7): 6171-6176.

Cullen, B. R. (2000). Nuclear RNA Export Pathways. *Molecular and Cellular Biology* **20**(12): 4181-4187.

Cullen, B. R. (1998). Retroviruses as Model Systems for the Study of Nuclear RNA Export Pathways. *Virology* **249**: 203-210.

Darbyshire, J. (2000). Therapeutic interventions in HIV infection - a critical view. *Tropical Medicine and International Health* **5**(7): 26-31.

De Clercq, E. (2001). New developments in anti-HIV chemotherapy. *Il Farmaco* **56**(2001): 3-12.

Deml, L., Bojak, A., **Steck, S.**, Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H. and Wagner, R. (2001). Multiple Effects of Codon Usage Optimization on Expression and Immunogenicity of DNA Candidate Vaccines Encoding the HIV-1 Gag Protein. *J. Virol.* **75**(22): 10991-11001.

Derebail, S.S., Heath, M.J. and DeStefano, J.J. (2003). Evidence for the differential effects of nucleocapsid protein on strand transfer in various regions of the HIV genome. *J. Biol. Chem.*-Paper in Press. Published on February 20, 2003 as Manuscript.

Favaro, J. P., Borg, K. T., Arrigo, S. J. and Schmidt, M. G. (1998). Effect of Rev on the Intranuclear Localization of HIV-1 Unspliced RNA. *Virology* **249**: 286-296.

Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. and Pavlakis, G. N. (1989). Rev protein of HIV-1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 1495-1499.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. and Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**: 475-483.

Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R. and Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *EMBO J.* **13**: 4105-4112.

Fling, S. P., Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155** (1): 83-88.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**: 1051-1060.

Frankhauser, C., Izaurralde, E., Adachi, Y., Wingfield, P. and Laemmli, U. K. (1991). Specific complex of HIV-1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* **11**: 2567-2575.

- Fritz, C C. and Green, M. R. (1996). HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr. Biol.* **6**: 848-854.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M. and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*, Feb 4; **397**(6718): 436-441.
- Graf, M. (2000). Untersuchungen über das Zusammenspiel von cis-aktiven Sequenzen und viralen transaktiven Proteinen bei der Expression später HIV-1 Genprodukte: Grundlage zur Entwicklung sicherer und effektiver Vektoren zur DNA-Vakzinierung und lentiviralen Gentherapie (Doktorarbeit - RIMMH, AG Wagner, Regensburg).
- Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K. and Wagner R. (2000). Concerted Action of Multiple *cis*-Acting Sequences is required for Rev Dependence of Late HIV-1 Gene Expression. *J. Virol.* **74**: 10822.
- Graham, F.L. and Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456-467.
- Graveley, B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* **6**: 1197-1211.
- Haas, J., Park, E.C. and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current Biology* **6**(3): 315-324.
- Hamilton, B.J.-N., Burns, C. M., Nichols, R. C. and Rigby, W. F. C. (1997). Modulation of AUUUA Response Element Binding by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 in Human T Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. **272** (45): 28732-28741.
- Hammarskjöld, M.L., Heimer, J., Hammarskjöld, B., Sangwan, I., Albert, L. and Rekosh, D. (1989). Regulation of HIV env expression by the rev gene product. *J. Virol.* **68**: 1959-1966.
- Hastings, M.L. and Krainer, A.R. (2001). Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 302-309.
- Henderson, B. R. and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and Nuclear Import and Export Factors: The Rev Nuclear Localisation Signal Mediates Specific Binding to Human Importin- $\beta$ . *J. Mol. Biol.* **274**: 693-707.
- Hentze, M. W. (1991). Determinants and regulation of cytoplasmic mRNA stability in eucaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acts* **1090**: 281-292.
- Huang, S. (2000). Review: Perinucleolar Structures. *Journal of Structural Biology*, **129**: 233-240.
- Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. and Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*, May 24; **345**(6273): 356-359.
- Iacampo, S. and Cochrane, A. (1996). HIV-1 Rev function requires continued synthesis of its target mRNA. *J. Virol.* **70**: 8332-8339.
- Itoh, M. Haga, I., Li, Q.H. and Fujisawa J.I. (2002). Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Research* **30** (24): 5452-5464.
- Jungert K. (2001). Etablierung eines Rev-abhängigen Reportersystems auf der Grundlage von GFP zur Identifizierung von Inhibitoren des Rev/RRE Systems (Diplomarbeit-RIMMH, AG Wagner, Regensburg).

- Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W. and Kitts, P. (1995). GFP as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques* **19**: 650-655.
- Kalland, K. H., Szilvay, A. M., Brokstad, K. A., Saetrevik, W. and Haukens, G. (1994 a). The HIV-1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear components. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7436-7444.
- Kalland, K. H., Szilvay, A. M., Langhoff, E. and Haukenes, G. (1994 b). Subcellular distribution of HIV-1 Rev and colocalization of Rev with RNA splicing factors in a speckled pattern in the nucleoplasm. *J. Virol.* **68**: 1475-1485.
- Kehlenbeck S. (2000). Grundlegende Untersuchungen zum Kernexport ungespleißter AT-reicher RNA Spezies durch Generierung quasilentiviraler Genkonstrukte (Diplomarbeit-RIMMH, AG Wagner, Regensburg).
- Kim, V. N., Mitrophanous, K., Kingsman, S. M. and Kingsman, M. A. (1998). Minimal requirement for a lentivirus vector based on HIV-1. *J. Virol.* **72**: 811-816.
- Kimura, T., Hashimoto, I., Yamamoto, A., Nishikawa, M. and Fujisawa, J. I. (2000). Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 gag mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin-B. *Genes Cells* **5**(4): 289-307.
- Kjems, J. and Askjaer, P. (2000). Rev Protein and Its Cellular Partners. *Advances in Pharmacology* **48**: 251-298.
- Kjems, J. and Sharp, P. A. (1993). The basic domain of Rev from HIV-1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J. Virol.* **67**: 4769-4776.
- Kjems, J., Frankel, A.D. and Sharp, P.A. (1991). Specific regulation of mRNA splicing *in vitro* by a peptide from HIV-1 Rev. *Cell* **67**: 169-178.
- Klimpton & Eneerman, 1992, *J. Virol.* **66**: 2232-2239. („MAGI“-Assay)
- Knippers, R. (1997). *Molekulare Genetik*. 7., durchgesehene und korrigierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York. ISBN 3-13-477007-5.
- Krecic, A.M. and Swanson, M.S. (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Current Opinion in Cell Biology*, **11**: 363-371.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lagnado, C. A., Brown, C. Y. and Goodall, G. J. (1994). AUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol. Cell. Biol.*, Vol. **14**(12): 7984-7995.
- Li, J., Liu, Y., Kim, B. O. and He, J. J. (2002 a). Direct Participation of Sam68, the 68-kDa Src-associated protein in mitosis, in the CRM1-mediated Rev nuclear export pathway. *J. Virol.* **76** (16): 8374-8382.
- Li, J., Liu, Y., Park, I.-W. and He, J. J. (2002 b). Expression of Exogenous Sam68, the 68-Kilodalton Src-Associated Protein in Mitosis, is Able to Alleviate Impaired Rev Function in Astrocytes. *J. Virol.* **76** (9): 4526-4535.

- Li, J., Tang, H., Mullen, T.M., Westberg, C., Reddy, T.R., Rose D.W. and Wong-Staal, F. (1999). A role for RNA helicase A in posttranscriptional regulation of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 709-14.
- Lin, Q., Taylor, S. J. and Shalloway, D. (1997). Specificity and determinants of Sam68 RNA binding. Implications for the biological function of K homology domains. *J. Biol. Chem.* **272**: 27274-27280.
- Liu, H.X., Zhang, M. and Kraine, A.R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes & Development* **12**: 1998-2012.
- Lu, X.B., Heimer, J., Rekosh, D. and Hammariskjold, M.L. (1990). U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev-regulated HIV env mRNA that remains unspliced. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 7598-7602.
- Luo, Y., Yu, H. and Peterlin, B. M. (1994). Cellular protein modulates effects of HIV-1 Rev. *J. Virol.* **68**: 3850-3856.
- Maldarelli, F., Martin, M. A. and Strebel, K. (1991). Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in HIV-1 RNA: novel level of gene regulation. *J. Virol.* **65**(11): 5732-5743.
- Malim, M. H. and Cullen, B. R. (1993). Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 6180-6189.
- Maniatis, T. and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416** (4): 499-506.
- Mariani, R., Rutter, G., Harris, M. E., Hope, T. J., Kräusslich, H.G. and Landau, N. R. (2000). A Block to HIV-1 Assembly in Murine Cells. *J. Virol.* **74** (8): 3859-3870.
- Marques, S.M.P., Veyrune, J.L., Shukla, R.R. and Kumar A. (2003). Restriction of HIV-1 Rev Function in Murine A9 Cells Involves the Rev C-Terminal Domain. *J. Virol.* **77** (5): 3084-3090.
- Meyer, B. E. and Malim, M. H. (1994). The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **8**: 1538-1547.
- Midgley C.A. and Murray N.E. (1985). T4 polynucleotide kinase: cloning of the gene (pseT) and amplification of its products. *EMBO* **4** (10): 2695-2703.
- Mikaélian, I., Krieg, M., Gait, M.J. and Karn, J. (1996). Interaction of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs. *J. Mol. Biol.* **257**: 246-264.
- Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L. and Minna, J.D. (1992). p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* **7**(1): 171-180.
- Modrow, S. und Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin - Oxford. ISBN 3-86025-274-7.
- Moore, J. P., Parren, P. W. H. I., and Burton, D. R. (2001). Genetic Subtypes, Humoral Immunity, and HIV-1 Vaccine Development. *J. Virol.* July 2001, p. 5721-5729.
- Muro, A.F., Caputi, M., Pariyarath, R., Pagani, F., Buratti, E. and Baralle F.E. (1999). Regulation of Fibronectin EDA Exon Alternative Splicing: Possible Role of RNA Secondary Structure for Enhancer Display. *Molecular and Cellular Biology* **19** (4): 2657-2671.

- Najera, I., Krieg, M. and Karn, J. (1999). Synergistic Stimulation of HIV-1 Rev-dependent Export of Unspliced mRNA to the Cytoplasm by hnRNP A1. *J. Mol. Biol.* **285**: 1951-64.
- Nakielnny, S., Fischer, U., Michael, W. M. and Dreyfuss, G. (1997). *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 269-301.
- Nasioulas, G., Zolotukhin, A.S., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C.P., Pavlakis, G.N. and Felber, B.K. (1994). Elements distinct from HIV-1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J. Virol.* **68**: 2986-2993.
- Niedrig, M., Hinkula, J., Weigelt, W., L'age Stehr, J., Pauli, G., Rosen, J. and Wahren, B. (1989). Epitope Mapping of Monoclonal Antibodies against HIV-1 Structural Proteins by Using Peptides. *J. Virol.* **63** (8): 3525-3528.
- Niedrig, M., Rabanus, J.P., L'age Stehr, J., Gelderblom, H.R. and Pauli, G. (1988). Monoclonal Antibodies Directed against HIV gag Proteins with Specificity for Conserved Epitopes in HIV-1, HIV-2 and SIV. *J. gen. Virol.* **69**: 2109-2114.
- O'Neil P.K., Sun, G., Yu, H., Ron, Y., Dougherty, J.P. and Preston B.D. (2002). Mutational Analysis of HIV-1 Long Terminal Repeats to Explore the Relative Contribution of Reverse Transcriptase and RNA Polymerase II to Viral Mutagenesis. *J Biol Chem* **277** (41): 38053-38061.
- O'Reilly, M. M., McNally, M. T. and Beemon, K. L. (1995). Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of HIV-1 RNA. *Virology* **213**: 373-385.
- Pandya, S., Boris-Lawrie, K., Leung, N. J., Akkina, R. and Planelles, V. (2001). Development of an Rev-Independent, Minimal SIV-derived Vector System. *Human Gene Therapy* **12**: 847-857.
- Parkin, N.T., Chamorro, M. and Varmus, H.E. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J. Virol.* **66** (8): 5147-5151.
- Pasquinelli, A.E., Ernst, R.K., Lund, E., Grimm, C., Zapp, M.L., Rekosh, D., Hammariskjold, M.L. and Dahlberg, J.E. (1997). The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *EMBO* **16** (24): 7500-7510.
- Pinol-Roma, S. (1997). HnRNP proteins and the nuclear export of mRNA. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **8**: 57-63.
- Pollard, V.W. and Malim, M.H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**: 491-532.
- Pongoski, J., Asai, K. and Cochrane, A. (2002). Positive and Negative Modulation of HIV-1 Rev Function by cis and trans Regulators of Viral RNA Splicing. *J. Virol.* **76** (10): 5108-5120.
- Powell, DM., Amaral, MC., Wu, JY., Maniatis, T. and Greene, WC. (1997). HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev responsive element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 973-78.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Qequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233.
- Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L.L., Mitsuya, H., Liou, R.S., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F. (1987). Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**: 57-69.

- Reddy, T. R. (2000). A single point mutation in the nuclear localization domain of Sam68 blocks the Rev/RRE-mediated transactivation. *Oncogene*, **19**: 3110-3114.
- Reddy, T.R., Tang, H., Xu, W. and Wong-Staal, F. (2000). Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of HIV and type D retroviral mRNA. *Oncogene* **19**: 3570-3575.
- Robertson, D. L., Hahn, B. H. and Sharp, P. M. (1995). Recombination in AIDS viruses. *J. Mol. Evol.* **40**: 249-259.
- Rosen, C.A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. (1988). Intragenic *cis*-acting art gene-responsive sequences of HIV. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 2071-2075.
- Saag, M. S., Kilby, J. M. (1999). HIV-1 and HAART: A time to cure, a time to kill. *Nat. Med.* **5**: 609 f.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467.
- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B. K. and Pavlakis, G. N. (1997). Inactivation of the HIV-1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* **71**(7): 4892-4903.
- Schwartz, S. (1998). *Cis*-Acting Negative RNA Elements on Papillomavirus Late mRNAs. *Seminars in Virology*, **8**: 291-300.
- Schwartz, S., Campbell, M., Nasioulas, G., Harrison, J., Felber, B. K. and Pavlakis, G. N. (1992 a). Mutational inactivation of an inhibitory sequence in HIV-1 results in Rev-independent *gag* expression. *J. Virol.* **66**(12): 7176-7182.
- Schwartz, S., Felber, B. K. and Pavlakis, G. N. (1992 b). Distinct RNA sequences in the *gag* region of HIV-1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J. Virol.* **66**(1): 150-159.
- Schweizer, M., Flory, E., Buchholz, C. J. and Cichutek, K. (2001). Retroviral Vectors. *Bundesgesundheitsbl.- Gesundheitsforsch.- Gesundheitsschutz* **44**: 1038-1046.
- Seguin, B., Staffa, A. and Cochrane, A. (1998). Control of HIV-1 RNA metabolism: role of splice sites and intron sequences in unspliced viral RNA subcellular distribution. *J. Virol.* **72**: 9503-9513.
- Shaw, G. and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**: 659-667.
- Sherman, M. P. and Greene, W. C. (2002). Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes and Infection* **4**: 67-73.
- Staffa, A.I. and Cochrane, A. (1995). Identification of Positive and Negative Splicing Regulatory Elements within the Terminal *tat-rev* Exon of HIV-1. *Molecular and Cellular Biology* **15** (8): 4597-4605.

- Stutz, F., Izaurralde, E., Mattaj, I. W. and Rosbach, M. (1996). A role for nucleoporin FG repeat domains in export of HIV-1 Rev protein and RNA from the nucleus. *Mol. Cell Biol.* **16**(12): 7144-7150.
- Szebeni, A., Herrera, J. E. and Olson, M. Q (1995). Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* **34**: 8037-8042.
- Tacke, R. and Manley, J. (1999). Determinants of SR protein specificity. *Current Opinion in Cell Biology*: **11**: 358-362.
- Tang, H., Kuhen, K. L. and Wong-Staal, F. (1999). Lentivirus Replication and Regulation. *Annu. Rev. Genet.* **33**: 133-170.
- Turner, B.G. and Summers, M. (1999). Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**: 1-32.
- Vartanian, J.P., Meyerhans, A., Asjo, B. and Wain Hobson, S. (1991). Selection, recombination and G → A hypermutation of HIV-1 genomes. *J. Virol.* **65**: 1779-1788.
- Vartanian, J.P., Meyerhans, A., Sala, M. and Wain Hobson, S. (1994). G → A hypermutation of the HIV-1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3092-3096.
- Wagner, R. (1992). Doktorarbeit - persönliche Mitteilung über die dem plin8p55Δ4-Vektor zugrundeliegende Klonierung.
- Wagner, R., Graf, M., Bieler, K., Wolf, H., Grunwald, T., Foley, P. and Überla, K. (2000). Rev-independent expression of synthetic *gag-pol* genes of HIV-1 and SIV: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **11**: 2403-2413.
- Weiss, R. A. and Wrangham, R. W. (1999). From *Pan* to Pandemic. *Nature*, Feb 4; **397**: 385-386.
- Wu & Kappes, 1997, *EMBO* **16**: 5113-5121. („MAGI“-Assay)
- Xu, Y., Reddy, TR., Fischer, WH. and Wong-Staal, F. (1996). A novel hnRNP specifically interacts with HIV-1 RRE RNA. *J. Biomed. Sci.* **3**: 82-91.
- Yi, R., Bogerd, H. P. and Cullen, R. (2002). Recruitment of the Crm1 Nuclear Export Factor is Sufficient to Induce Cytoplasmic Expression of Incompletely Spliced HIV mRNAs. *J. Virol.* **76** (5): 2036-2042.
- Zhu, J., Mayeda, A. and Krainer, AR. (2001). Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNPA1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell* **8** (6): 1351-1361.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J. Naldini, L. and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15**: 871-875.



## H. Veröffentlichungen

### H.1. Papers

Deml, L., Bojak, A., **Steck, S.**, Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H., and Wagner R. (2001). Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. J. Virol. 75(22):10991-1001.

Deml, L., **Steck, S.**, Bojak, A., Wolf, H. and Wagner, R. (in Vorbereitung). Modulatory effects of CpG oligonucleotides on the immunogenicity of human immunodeficiency virus type -1 (HIV-1) Pr55<sup>gag</sup> virus-like particles.

**Steck, S.** and Wagner, R. (in Vorbereitung). Influence of the codon-usage and *cis*-active sequences for RNA stability and expression of late HIV-1 gene products.

**Steck, S.** and Wagner, R. (in Vorbereitung). Influence of the codon-usage for the timely regulated gene expression during HIV-1 replication.

### H.2. Vorträge

**Steck, S.** and Wagner, R. (2003). Influence of the "Codon Usage" on the Time Regulated Gene Expression During HIV Replication. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Berlin.

Wolf, H., Bieler, K., Bojak, A., Deml, L., Graf, M., Ludwig, C., Notka, F., **Steck, S.**, Wild, J., Zhang, J., Wagner, R., Moji, P., Heeney, J., Stahl-Hennig, C. (2002). From synthetic genes to an HIV DNA vaccine. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Erlangen.

Deml, L., Bojak, A., **Steck, S.**, Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, Wolf, H., and Wagner, R. (2001). Multiple Effects of Codon Usage Optimization on the Expression and Immunogenicity of DNA Candidate Vaccines Encoding the Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) Gag Protein. European Conference on Experimental AIDS Research, Birmingham.

**Steck, S.**, Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Wolf, H. and Wagner, R. (2001). Experiments to the gene expression of HIV-1 dependent on splice sites and inhibitory sequences. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Dresden.

Kehlenbeck, S., Jungert, K., **Steck, S.**, Hoffman, H., Graf, M., and Wagner, R. (2001). Codon Usage Modification: Turning the GFP Dependent of the HIV-1 Rev/RRE System. European Conference on Experimental AIDS Research, Genua.

Deml, L., Bojak, A., **Steck, S.**, Graf, M., Wild, J., Wolf, H., and Wagner, R. (2001). Multiple effects of codon usage optimisation on the expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1. European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh.

Deml, L., **Steck, S.**, Bojak, A., Graf, M., Bieler, K., Wolf, H., und Wagner, R. (2000). Synthetische Nukleinsäuren: Ein neuartiger Ansatz zur Steigerung der Immunogenität aktueller Impfstoffkandidaten. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.

**Steck, S.**, Deml, L., Wolf, H., und Wagner, R. (2000). Einfluß interner CpG-Motive auf die Immunogenität von DNA Impfstoffen. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.

Deml, L., **Steck, S.**, Bojak, A., Graf, M., Bieler, K., Wolf, H., und Wagner, R. (2000). Synthetische Nukleinsäuren: Ein neuartiger Ansatz zur Steigerung der Immunogenität aktueller HIV-1 Impfstoffkandidaten. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.

Deml, L., **Steck, S.**, Bojak, A., Wolf, H., und Wagner, R. (2000). Modulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides on the immunogenicity of actual HIV-1 candidate vaccines. European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid.

Deml, L., **Steck, S.**, Schirmbeck, R., Reimann, J., Wolf, H., und Wagner, R. (1999). Unterschiedlicher Einfluß von CpG Oligodeoxynucleotides auf die Immunogenität von löslichen und partikulären HIV Impfstoff Kandidaten. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GFV, Bremen.

Deml, L., Schirmbeck, R., **Steck, S.**, Reimann, J., Wolf, H., und Wagner, R. (1999). Ambivalent effects of CpG oligodeoxynucleotides on the immunogenicity of soluble and particulate HIV vaccine components. European Conference, Perspectives on Infectious Disease Research, Dresden.

Deml, L., **Steck, S.**, Schirmbeck, R., Reimann, J., Wolf, H., und Wagner, R. (1999). Modulatorische Eigenschaften von CpG-haltigen Nukleinsäuren auf die Immunogenität unterschiedlicher HIV Vakzinekandidaten. Institutseminar am Institut der Virologie an der Universität Mainz.

## H.3. Posterpräsentationen

**Steck, S.** and Wagner, R. (2003). Influence of the “Codon Usage” on the Time Regulated Gene Expression During HIV Replication. 9. Deutscher und 14. Österreichischer AIDS Kongress, Hamburg.

**Steck, S.**, Kehlenbeck, S., Graf, M. and Wagner, R. (2002). Impact of Codon Usage on Timely Regulated Lentiviral Gene Expression. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Erlangen.

**Steck, S.**, Kehlenbeck, S., Graf, M. and Wagner, R. (2002). Impact of Codon Usage on Timely Regulated Lentiviral Gene Expression. European Conference on Experimental AIDS Research, Genua.

Deml, L., Bojak, A., **Steck, S.**, Graf, M., Wild, J., Wolf, H. und Wagner, R. (2001). Multiple Effekte von Kodon-Modifikationen auf die Expressionsraten und Immunogenität von HIV-1 spezifischen DNA Impfstoffen. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Dresden.

Deml, L., **Steck, S.**, Bojak, A., Wolf, H., Wagner R. (2000). Modulatory effects of CpG oligonucleotides on the immunogenicity of actual HIV-1 candidate vaccines. European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid.

**Steck, S.**, Deml, L., Bojak, A., Graf, M., Wolf, H. und Wagner, R. (2000). Einfluß von internen CpG Oligodeoxynukleotiden auf die Immunogenität des syngag-Plasmides. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.

## I. Danksagung

Diese Doktorarbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene der Universität Regensburg. *Herrn Prof. Dr. Hans Wolf* danke ich für die Bereitstellung des modernen Arbeitsplatzes.

Bei *Herrn Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer* möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Die Arbeit wurde von *Herrn Prof. Dr. R. Wagner* angeregt. Bei ihm möchte ich mich für das Überlassen des Themas, das damit in mich gesetzte Vertrauen und die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei *Agnes Hotz-Wagenblatt* (Deutschland), *Jørgen Kjems* (Dänemark), *Ole Matzura* (Niederlande?), *Stefan Stamm* (Deutschland) und *Michael Zuker* (Amerika) für ihre Ratschläge und Tipps bei einigen Auswertungsproblemen bedanken.

Einen besonderen Dank geht an *Herrn Dr. L. Deml* für seine stete Diskussionsbereitschaft und unermüdliche konstruktive Kritik.

Ebenso möchte ich mich bei allen meinen anderen Laborkollegen (*Praktikanten, Diplomanden, Doktoranden, Postdocs, MTAs*) für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Aufgrund der Gefahr hin, dass ich nur Eine/n vergesse, mögen sie hier ungenannt bleiben. *Holger* danke ich besonders für seine Bemühungen um ein erfolgreiches Sequenzieren der chimären Proviruskonstrukte.

Mein besonderer Dank gilt *meiner Familie*, die durch ihre ideelle und finanzielle Unterstützung den Grundstein für den erfolgreichen Abschluß meiner Dissertation gelegt haben.

*Last but not least* danke ich außerdem meinem Freundeskreis in Regensburg, München und anderenorts für die „seelisch-moralische“ Unterstützung während meiner Dissertation in speziellen, besonderen und allgemeinen Dingen. Besonders Danke ich *Begahn, Heike* und *Kathrin* für ihre langjährige tiefe Freundschaft.